

**Vergleichende Charakterisierung der Adhäsionsproteine Vinculin und
Metavinculin:
Neue Aspekte der zellulären Funktion von Metavinculin**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Sebastian Witt
aus Berlin

1. Referentin: Prof. Dr. B.M. Jockusch

2. Referent: Prof. Dr. D. Heinz

eingereicht am: 14.08.2003

mündliche Prüfung (Disputation) am: 28.10.2003

Darin besteht das Wesen der Wissenschaft. Zuerst denkt man an etwas, das wahr sein könnte. Dann sieht man nach, ob es der Fall ist, und im allgemeinen ist es nicht der Fall.

Bertrand Russell, brit. Philosoph und Mathematiker, 1950

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinschaftlichen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Witt, S., Zieseniss, A., Jockusch, B.M., Illenberger, S. (2001) Comparative studies on vinculin and metavinculin tail domains.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ), Straßburg, Frankreich. *Biology of the Cell*, 93(3/4), 237

Witt, S., Jockusch, B.M., Illenberger, S. (2003) Comparative studies on vinculin and metavinculin tail domains.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ), Bonn.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	VI
Zusammenfassung	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Vinculin	2
1.1.1 Funktion und Bedeutung	2
1.1.2 Molekularstruktur	4
1.1.3 Liganden	6
1.1.4 Saure Phospholipide als Regulatoren Vinculins	7
1.1.5 Vinculin und die Bindung an F-Aktin	10
1.1.6 Vinculin in der Zelle – ein Modell	12
1.2 Metavinculin	13
1.2.1 Aufbau und Molekularstruktur	13
1.2.2 Vinculin und Metavinculin – Gemeinsamkeiten und Unterschiede	15
1.2.2.1 Expression und Lokalisation	15
1.2.2.2 Liganden und Regulation	16
1.2.3 Funktion und Bedeutung	17
1.3 Ziel der Arbeit	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte	20
2.1.2 Chemikalien und Enzyme	21
2.1.3 Oligonukleotide	21
2.1.3.1 Klonierungsprimer	21
2.1.3.2 Sequenzierungsprimer	22
2.1.4 Genbanken	22
2.1.5 Vektoren	23
2.1.6 Antikörper	24
2.1.7 Organismen	25

2.1.7.1	Bakterien	25
2.1.7.2	Hefen	25
2.1.7.3	Tierische Zelllinien.....	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.1.1	Herstellung Calciumchlorid-kompetenter Bakterien.....	27
2.2.1.2	Transformation kompetenter Zellen.....	27
2.2.1.3	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	27
2.2.1.4	Plasmid-Midi- bzw. Maxi-Präparation.....	28
2.2.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
2.2.1.6	Fällung von Nukleinsäuren	29
2.2.1.7	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	29
2.2.1.8	Ligation	29
2.2.1.9	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	30
2.2.1.10	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	30
2.2.1.10.1	Fusions-PCR.....	31
2.2.1.11	Klonierung von PCR-Produkten	31
2.2.1.12	Gerichtete Mutagenese	31
2.2.1.13	DNA-Sequenzierung	32
2.2.1.14	Agarose-Gelelektrophorese	33
2.2.1.15	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.2.2	Biochemische Methoden.....	34
2.2.2.1	Proteinbestimmung.....	34
2.2.2.1.1	Proteinbestimmung mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten.....	34
2.2.2.1.2	Proteinbestimmung nach Bradford	34
2.2.2.1.3	Densitometrische Proteinbestimmung	34
2.2.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	35
2.2.2.2.1	Herstellung der Gele	35
2.2.2.2.2	Elektrophorese	36
2.2.2.3	„Semidry“ Western-Blot	37
2.2.2.3.1	Nachweis von immobilisierten Proteinen mit Antikörpern	37
2.2.2.4	Epitopkartierung monoklonaler Antikörper mit PepScan-Membranen	39
2.2.2.5	ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“)	40
2.2.2.6	CD-Spektroskopie	41
2.2.2.7	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	41
2.2.2.7.1	Expression von rekombinanten Proteinen	42
2.2.2.7.2	Zellaufschluß und Proteinaufreinigung über Ni-NTA-Agarose-Beads	42

2.2.2.8	Umpuffern von Proteinen.....	44
2.2.2.8.1	Umpuffern von Proteinen über Gelfiltration: PD10-Säulen	44
2.2.2.8.2	Umpuffern kleinerer Volumina über Nitrocellulosemembranen	44
2.2.2.9	Ankonzentrieren von Proteinen.....	44
2.2.2.10	Kosedimentation mit F-Aktin.....	44
2.2.2.10.1	„High speed“-Kosedimentation	45
2.2.2.11	Bündelungsassays mit TRITC-markiertem Phalloidin.....	46
2.2.2.12	Proteinfällung	46
2.2.2.12.1	TCA-Fällung.....	46
2.2.2.12.2	Methanol/Chloroform-Fällung	46
2.2.2.13	Chemische Vernetzung („chemical crosslink“)	47
2.2.2.14	Saccharose-Lipidvesikel-Pulldown	47
2.2.2.15	Herstellung von Gewebeextrakten	48
2.2.2.16	Das „Yeast Two-Hybrid“ System	49
2.2.3	Zellbiologische Methoden	50
2.2.3.1	Kultivierung von Zellen	50
2.2.3.2	Transfektion von Zellen	50
2.2.3.3	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen	51
2.2.3.4	Immunfluoreszenz.....	51
2.2.4	Histologische Methoden	52
2.2.4.1	Herstellung von Gefrierschnitten	52
2.2.4.2	Färbung von Gefrierschnitten.....	52
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Konstrukte und Proteinexpression	53
3.1.1	Klonierung	53
3.1.2	Proteinaufreinigung	56
3.1.3	CD-Spektren	57
3.2	„Yeast Two-Hybrid“ Analysen.....	59
3.3	Zelluläre Analysen	61
3.3.1	Charakterisierung Metavinculin-spezifischer Antikörper.....	61
3.3.2	Transfektionsexperimente.....	64
3.3.3	Expression von Metavinculin in Muskelgewebe	66
3.3.3.1	Quantitative Analyse.....	66
3.3.3.2	Qualitative Analyse.....	69
3.4	Vergleichende biochemische Charakterisierung.....	76

3.4.1	Vergleichende Analysen der isolierten Schwanzdomänen von Vinculin und Metavinculin	76
3.4.1.1	Interaktion mit F-Aktin	76
3.4.1.1.1	Filamente	76
3.4.1.1.2	Metavinculin-Schwanz und Vinculin-Schwanz zeigen ein ähnliches Bindungsverhalten für F-Aktin.....	77
3.4.1.1.3	Bei Inkubation mit F-Aktin dimerisiert Metavinculin-Schwanz schlechter als das entsprechende Vinculin-Schwanz- Konstrukt	79
3.4.1.2	Interaktion mit sauren Phospholipiden.....	81
3.4.1.2.1	Bei Inkubation mit PIP ₂ oligomerisiert Metavinculin-Schwanz schlechter als das entsprechende Vinculin-Schwanz-Konstrukt.	81
3.4.1.2.2	Metavinculin-Schwanz bindet schlechter an saure Phospholipide als das entsprechende Vinculin-Schwanz-Konstrukt	83
3.4.1.2.3	Die Bindung an F-Aktin lässt sich bei Metavinculin-Schwanz und Vinculin-Schwanz in ähnlicher Weise durch Inkubation mit sauren Phospholipiden verdrängen.....	85
3.4.1.3	Hetero-Oligomerisierung und Einfluss auf Aktin-Organisation	86
3.4.1.3.1	Bei Inkubation mit PIP ₂ bilden Metavinculin-Schwanz und Vinculin-Schwanz Heterodimere	87
3.4.1.3.2	Filamente	89
3.4.2	Gesamtproteine	91
3.4.2.1	Metavinculin und Vinculin kosedimentieren nicht mit F-Aktin	91
3.4.2.2	Die Kopf-Schwanz- Interaktion ist für rekonstituiertes Metavinculin wie Vinculin in gleicher Weise durch Inkubation mit PIP ₂ lösbar.....	92
3.4.2.3	Metavinculin und Vinculin pelletieren nicht mit Saccharose-gefüllten Lipidvesikeln ..	93
3.4.3	Zusammenfassung	95
4	Diskussion.....	97
4.1	Spezifische Liganden	97
4.2	Modulation der Aktivierung und Ligandenwechselwirkung	98
4.2.1	Kopf-Schwanz-Interaktion.....	100
4.2.2	Entfaltung der Schwanzdomäne	101
4.2.2.1	Saure Phospholipide.....	102
4.2.2.2	Aktin.....	103
4.2.3	Oligomerisierung	105
4.2.3.1	Homodimere.....	106
4.2.3.2	Heterodimere.....	106

4.3	Metavinculin – Expression und zelluläre Bedeutung.....	108
4.3.1	Expressionsnachweis durch spezifische Antikörper	109
4.3.2	Metavinculin und Cardiomyopathien	110
4.4	Die Funktion von Metavinculin in der Zelle – Modellvorschläge	112
4.4.1	Welche Auswirkungen hat die Ausbildung von Metavinculin / Vinculin-Heterodimeren?	112
4.4.2	Warum wird Metavinculin offenbar nie ohne Vinculin exprimiert?	115
4.4.3	Wie verläuft der Einbau von Metavinculin in Adhärenzverbindungen?	115
4.5	Ausblick	117
5	Literatur	119
6	Anhang.....	130
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	130
6.2	Tabellenverzeichnis	132
6.3	„Crosslinks“ mit F-Aktin	133
	Danksagung.....	134
	Lebenslauf	135

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
α -(in Verbindung mit Antikörpern)	anti-
A, mA	Ampere, Milliampere
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	„American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
BiPro	Birkenprofilin
bp	(engl.) Basenpaare
BSA	(engl.) Rinderserumalbumin
cDNA	complementary DNA
C-Terminus	Carboxyterminus
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DSP	Dithiobissuccinimidylpropionat
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethyl-Aminopropyl)-Carbodiimid
ELISA	“Enzyme linked immunosorbent assay”
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	(engl.) Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Erdbeschleunigung
g, mg, μ g	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
G-Aktin	globuläres Aktin
HCl	Salzsäure
HMW	„high molecular weight marker“
HRP	(engl.) Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Kd	Dissoziationskonstante
kD, kDa	1000 Dalton
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria Bertani Broth
LMW	„low molecular weight marker“
m, cm, mm, μ m	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer
M, mM, μ M, nM	molar, millimolar, mikromolar, nanomolar
MCS	“multiple cloning site”

mol, mmol, μ mol, nmol, pmol	Mol, Millimol, Mikromol, Nanomol, Pikomol
MQ	Milli Q-Wasser
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
MVI	(engl.) Metavinculin-Einschub
MVT	(engl.) Metavinculin-Schwanzdomäne
MW	(engl.) Molekulargewicht
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
N-Terminus	Aminoterminus
OD _x	Optische Dichte bei $x=\lambda$ Nanometer
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	(engl.) Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s, min, h	Sekunde, Minute, Stunde
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N, N – Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
TRITC	Tetramethylisothiocyanat
ün	Über Nacht
UV	Ultraviolett
VASP	Vasodilator stimulated phosphoprotein
VT	Vinculin-Schwanzdomäne
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid
Y2H	„Yeast Two-Hybrid“ System
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Vinculin ist ein Strukturprotein des cytoplasmatischen Plaques von Adhärenzverbindungen, in denen es wesentlich an der Verankerung des Aktin-Cytoskeletts an der Zellmembran beteiligt ist. Es besitzt eine muskelspezifische Spleißvariante, das sogenannte Metavinculin. Dieses unterscheidet sich von Vinculin lediglich durch einen 68-79 großen Einschub in der ca. 200 Aminosäuren großen Schwanzdomäne. Die Korrelation eines Mangels oder einer Mutation von Metavinculin mit dem Auftreten von Erkrankungen des Herzens weist auf eine spezifische Funktion von Metavinculin im lebenden Organismus hin, die genaue zelluläre Funktionsweise ist jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt unverstanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Metavinculin bezüglich seiner zellulären Bedeutung näher zu charakterisieren. Eine Untersuchung der gewebspezifischen Expression von Metavinculin unter Verwendung monoklonaler Metavinculin-spezifischer Antikörper ergab eine starke Expression des Proteins in glatter Muskulatur. Kontroversen bezüglich der Präsenz des Proteins in Skelettmuskulatur konnten durch den Nachweis in Gewebeextrakten und auf Gefrierschnitten von Mäusen ausgeräumt werden. Überraschend in Zusammenhang mit dem Auftreten von Herzerkrankungen beim Menschen war die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte äußerst geringe Expression des Proteins in Herzen von Mäusen und Ratten. Metavinculin-spezifische Liganden wurden auch in der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert. Zusammengenommen implizieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass der spezifische Einfluss von Metavinculin auf das Mikrofilamentsystem nicht in der Rekrutierung spezifischer, neuer Liganden liegt, sondern vielmehr auf der Modulation bestehender Adhärenzverbindungen beruht.

Die biochemische Charakterisierung des Proteins ergab einen deutlichen modulativen Einfluss des stark sauren Metavinculin-Einschubs auf Ligandenwechselwirkungen innerhalb der Schwanzdomäne. Insbesondere auf die Bindung saurer Phospholipide und die Homodimerisierung der Metavinculin-Schwanzdomäne wirkt sich der Metavinculin-Einschub inhibierend aus. Die inhibitorische Wirkung des Metavinculin-Einschubs auf diese Ligandenwechselwirkungen konnte durch eine Neutralisation seiner negativen Ladung aufgehoben werden. Ein direkter Einfluss des Metavinculin-Einschubs auf die Bindung an das Aktin-Cytoskelett konnte nicht nachgewiesen werden, eine inhibitorische Veränderung der Dimerisierungseigenschaften könnte jedoch einen modulierenden Einfluss des Metavinculin-Einschubs auf die Ausbildung von Aktin-Suprastrukturen erklären. Die Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften von Metavinculin in dieser Arbeit erweitert den bisherigen Kenntnisstand und legt bedeutende Unterschiede zu Vinculin in der Regulation des Proteins durch saure Phospholipide dar. Insbesondere der Nachweis von Metavinculin / Vinculin-Heterodimeren erlaubt die Aufstellung neuer Modelle zur möglichen Modulation von Adhärenzverbindungen durch die Expression von Metavinculin und somit zur zellulären Funktion des Proteins.

1 Einleitung

Im vielzelligen Organismus ist es unabdingbar, dass Zellen in vielfältiger Weise mit sich selbst und mit der extrazellulären Matrix interagieren. Zu diesem Zweck bilden sie Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakte aus. Während die molekulare Zusammensetzung in Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltypus stark variieren kann, ist der strukturelle Aufbau dieser Kontakte jedoch immer ähnlich. Im Inneren der Zelle verbindet ein großer Komplex verschiedener intrazellulärer Anheftungsproteine die Filamente des Cytoskeletts mit Transmembran-Verbindungsproteinen. Diese vermitteln über homophile Interaktionen ihrer großen extrazellulären Domänen Zell-Zell-Adhäsion oder durch Interaktion ihrer extrazellulären Domänen mit Proteinen der extrazellulären Matrix die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix (Abbildung 1). Mit dem dynamischen und kontraktile Mikrofilamentsystem assoziierte Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte ermöglichen dem tierischen Organismus viele elementare Prozesse wie beispielsweise Zellbewegung in der Embryogenese, Wundheilung, Muskelkontraktion und die Ausbildung vieler Gewebetypen.

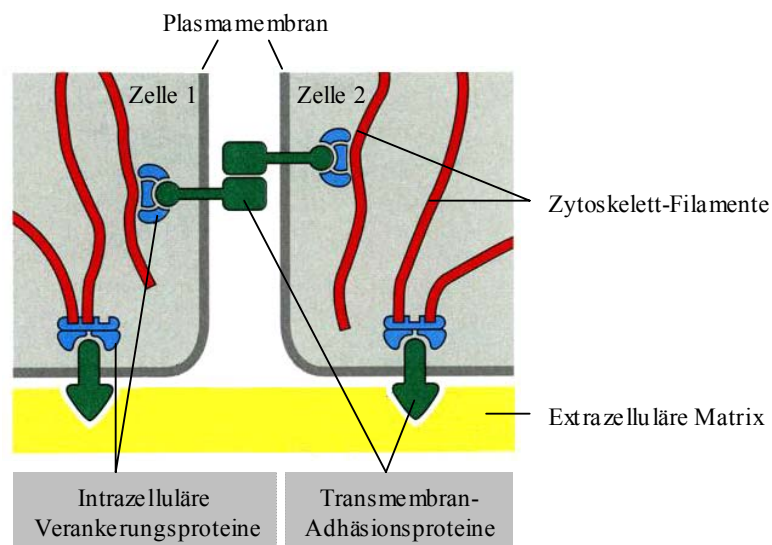


Abbildung 1: Der Aufbau von Adhäsionsverbindungen (entnommen aus: Alberts et al.: *Molekularbiologie der Zelle*)

Die Abbildung zeigt stark schematisiert die Verbindung des Cytoskeletts (rot) mit intrazellulären Verankerungskomplexen (blau). Diese sind mit Transmembranproteinen (grün) assoziiert, die die Zell-Zell-Adhäsion und Zell-Matrix-Adhäsion vermitteln.

Wichtiger Bestandteil der mit dem Aktin-Cytoskelett verbundenen intrazellulären Adhäsionskomplexe ist das Strukturprotein Vinculin, mit dessen Eigenschaften sich die vorliegende Arbeit befasst.

1.1 Vinculin

Vinculin wurde ursprünglich aus Putenmagen als Nebenprodukt einer α -Actinin und Filaminaufreinigung isoliert (Geiger, 1979). Es handelt sich um ein hochkonserviertes Strukturprotein, das zentraler Bestandteil von Zell-Zell-, sowie Zell-Matrix-Verbindungen vieler Gewebe- und Zelltypen von Vertebraten und Invertebraten ist. In diesen Strukturen ist Vinculin spezifisch mit cytoplasmatischen Proteinkomplexen assoziiert (siehe Abbildung 1 und Kapitel 1.1.3), die der Verankerung von Mikrofilamenten an der Plasmamembran dienen (Geiger et al., 1981; Geiger et al., 1980). In Muskelgewebe ist Vinculin daher überwiegend in den Glanzstreifen benachbarter Herzmuskelzellen (Koteliensky & Gneushev, 1983), den Membran-assoziierten „dense plaques“ der glatten Muskulatur (Small, 1985) sowie am Sehnenansatz und motorischen Endplatten der Skelettmuskeln (Yorifuji & Hirokawa, 1989) lokalisiert. Auch in den Adhäsionsplaques sogenannter „Costamere“, die in gestreiften Muskelzellen den peripheren Bereich der Z-Linien darstellen und eine Verankerung mit der extrazellulären Matrix vermitteln, ist Vinculin zu finden (Koteliensky & Gneushev, 1983; Pardo et al., 1983a; Pardo et al., 1983b; Shear & Bloch, 1985).

Vinculin wurde auch in einer Vielzahl von Nicht-Muskelzellen und Zelllinien nachgewiesen (Endo & Masaki, 1982; Lehto & Virtanen, 1985; Massa et al., 1995; Noda & Mitsui, 1993; Yoshimura et al., 1986), sogar in Blutplättchen (Horvath et al., 1992; Koteliensky et al., 1984; Rosenfeld et al., 1985) und Lymphozyten (Marchisio et al., 1988) mit lediglich temporärer Adhäsion wird es exprimiert. Die offenbar ubiquitäre Expression und die Lokalisation in cytoplasmatischen Adhäsionsplaques deuten auf eine essentielle Funktion von Vinculin bei der Zelladhäsion hin.

Wie durch Mikroinjektion von fluoreszenzmarkiertem Protein in kultivierte Zellen gezeigt werden konnte, liegt Vinculin neben der mit Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten assoziierten Form zusätzlich ungebunden innerhalb eines cytoplasmatischen „Pools“ vor (Burrige & Feramisco, 1980). Zwischen beiden Zuständen besteht ein dynamisches Gleichgewicht mit einem schnellen Austausch zwischen der freien und der Mikrofilament-assoziierten Form (Geiger et al., 1984; Lee & Otto, 1997).

1.1.1 Funktion und Bedeutung

Hinweise auf die Funktion und Bedeutung von Vinculin lassen sich aus Organismen sowie Zellen gewinnen, in denen die Expression von Vinculin modifiziert wurde. In beiden Fällen hat ein Fehlen von Vinculin drastische Auswirkungen: Vinculin-defiziente Mäuse sterben am Tag 10 der Embryonalentwicklung aufgrund von Defekten in der Neural- und Herzentwicklung (Xu et al., 1998b): Die Neuralplatten können sich nicht zum Neuralrohr schließen; ein Phänotyp, der sich vermutlich auf veränderte Motilität und Formänderung der betreffenden Zellen zurückführen lässt. Ein zweiter und wahrscheinlich letaler Defekt der Vinculin-Null-Mutanten ist die gravierende Missbildung

des Herzens, das nicht in der Lage ist zu kontrahieren. Auch ein Ausschalten des Vinculin-Gens im Nematoden *Caenorhabditis elegans* führt bereits im L1-Larvenstadium zu einem Verlust der Muskelaktivität und zum Tod (Barstead & Waterston, 1991). Eine Ausnahme bildet *Drosophila*, da in diesem Fall eine fehlende Vinculinexpression die Vitalität und Fertilität der Tiere nicht beeinträchtigt (Alatortsev et al., 1997).

In der Regel hat die Veränderung der Vinculinexpression jedoch einen deutlichen Einfluss, wie sich auch durch Untersuchungen an kultivierten Zellen belegen lässt:

Eine gezielte Reduktion der Vinculinexpression in 3T3-Zellen (Fibroblastenzelllinie aus Mausembryonen) durch Antisense-Transfektion führt zu einer in Relation zu untransfizierten Zellen erhöhten Motilität der Zellen (Rodriguez Fernandez et al., 1993). Eine Verminderung des Vinculingehalts wurde auch für verschiedene Tumorzelllinien sowie für menschliche Tumoren beschrieben (Raz und Geiger, 1982; Raz et al., 1986). Eine Wiederherstellung der Vinculinexpression in kultivierten Tumorzellen durch Transfektion führt zu der Ausbildung normaler Fokalkontakte und einer deutlich reduzierten tumorigenen Aktivität der Zellen (Rodriguez Fernandez et al., 1992a; Samuels et al., 1993). Bei Überexpression von Vinculin in 3T3-Zellen sind die Adhäsion und der Aufbau von Adhäsionskontakten deutlich erhöht, wohingegen die Motilität der Zellen deutlich verlangsamt ist (Rodriguez Fernandez et al., 1992b).

Auch die Inaktivierung des Vinculingens mittels homologer Rekombination in F9-Zellen (embryonale Maus-Karzinoma-Zellen) erbrachte ähnliche Ergebnisse (Coll et al., 1995): Verglichen mit Wildtypzellen weisen die Vinculin-null-(F9 γ 229)-Zellen eine deutlich erhöhte Motilität auf bei gleichzeitiger Abnahme der Adhäsion an verschiedene Substrate. Die Fähigkeit, sich auf der Kulturschale auszubreiten ist stark beeinträchtigt, und die Zellen weisen eine eher abgerundete Morphologie auf (Coll et al., 1995, Volberg et al., 1995). Die Ausbildung von Fokalkontakten bleibt jedoch vermutlich durch eine verstärkte Produktion alternativer Strukturproteine, wie z.B. α -Actinin erhalten (Volberg et al., 1995). Diese Fokalkontakte unterscheiden sich mikroskopisch nicht von denen der Kontrollzellen (Volberg et al., 1995), allerdings wird durch diese Fokalkontakte eine zu Wildtypzellen vergleichsweise schwächere Adhäsion vermittelt (Coll et al., 1995). Re-Expression von Vinculin nach Transfektion bewirkt eine Normalisierung des Adhäsions- und Motilitätsverhaltens in F9 γ 229-Zellen (Xu et al., 1998a).

Diese Untersuchungen belegen, dass Vinculin als zentrales Strukturelement Aktin-assoziiierter Adhärenzverbindungen essentiell an zellulären Vorgängen wie der Ausbildung der Zellform, der Adhäsion sowie der Motilität beteiligt ist.

1.1.2 Molekularstruktur

Vinculin besteht aus 1066 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 116 kDa (Coutu & Craig, 1988; Price et al., 1989). Es ist ein Multidomänen-Protein, welches aus einer N-terminalen globulären Kopfdomäne (90 kDa) und einer C-terminalen Schwanzdomäne (27 kDa) aufgebaut ist (Bendori et al., 1989; Price et al., 1989). Verbunden sind diese Domänen über einen kurzen prolinreichen Bereich, der auch als Nacken- oder Gelenkregion bezeichnet wird (Price et al., 1989). Innerhalb dieser Region befinden sich zwei Schnittstellen der GluC-Endoprotease (V8-Protease), durch die Kopf- und Schwanzdomäne voneinander getrennt werden können (Price et al., 1989). Hochauflösende elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen eine dreilappige, Kleeblatt-ähnliche Struktur für die Kopfdomäne und eine 19 nm lange, aus vier Domänen aufgebaute perlschnurartige Gestalt für den Schwanzbereich des Moleküls (Milam, 1985; Molony & Burridge, 1985; Winkler et al., 1996). Darüber hinaus scheint die Schwanzregion gegenüber der Kopfdomäne eine große Flexibilität aufzuweisen, die möglicherweise durch die prolinreiche Nacken- bzw. Gelenkregion bedingt ist und so die Bindung der Schwanzdomäne an den Kopf des Proteins ermöglicht (Beck, 1989; Winkler et al., 1996; siehe Abbildung 2).

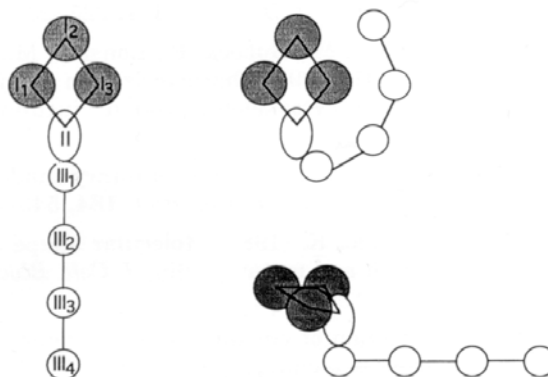


Abbildung 2: Schematische Darstellung verschiedener Konformationen von Vinculin nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen (aus Winkler et al., 1996)

Die Schwanz-Domäne ist gegenüber der Kopfdomäne hochflexibel, wahrscheinlich bedingt durch eine prolinreiche Scharnierregion. Wie mittels Elektronenmikroskopie erkennbar, ist die Kopfdomäne als dreiteilige Struktur dargestellt (bezeichnet mit I1, I2 und I3). Elektronendichte Bereiche der Schwanzdomäne sind mit III1 – III4 gekennzeichnet.

Die Kristallstruktur der Vinculinschwanzdomäne wurde aufgeklärt (Bakolitsa et al., 1999; siehe Abbildung 3). Sie besteht aus einem Bündel von 5 antiparallelen α -Helices, die durch kurze Schleifen aus 3-8 Aminosäuren miteinander verbunden sind. Das helikale Bündel hat eine Länge von 60 Å und

einen Durchmesser von 20-30 Å. An der Basis wird es von einem basischen Kragen umfasst, der am C-Terminus in einer haarnadelförmigen Schleife, dem sogenannten hydrophoben Finger, endet. Alle 5 Helices sind deutlich amphipatisch, wobei hydrophobe Aminosäurereste vorwiegend ins Innere des Bündels ragen, während hydrophile Aminosäuren nach außen orientiert sind. Innerhalb der Vinculin-Schwanzdomäne besitzen besonders Helix 3 sowie der hydrophobe Finger am extremen C-Terminus einen ausgeprägt hydrophoben Charakter. Die Helices 1 und 2 sind relativ kurz (16-20 Aminosäuren), während die Helices 3 und 4 (29 und 31 Aminosäuren) eine lange, geschlossene antiparallele Haarnadelschleife formen. Helix 5 ist mit 34 Aminosäuren die längste Helix. Sie liegt nahezu parallel zu Helix 1. Die spezifische Kombination kurzer und langer Helices führt zu einer Spalte von ca. 15 Å im Durchmesser.

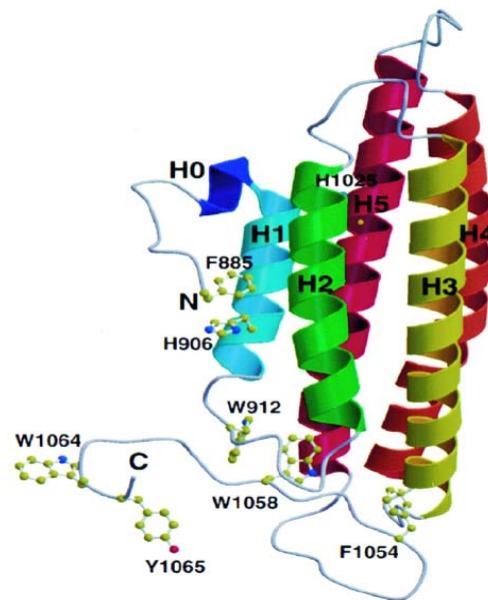


Abbildung 3: Kristallstruktur der Vinculin-Schwanzdomäne (AS 885-1066; entnommen aus Bakolitsa et al., 1999)

Die Vinculin-Schwanzdomäne besteht aus fünf antiparallelen α -Helices (H1-H5), welche durch kurze Schleifen miteinander verbunden sind. Die Seitenketten aller aromatischen Aminosäuren sind in der Abbildung hervorgehoben. Das Bündel wird an der Basis von einem hydrophoben Kragen umfasst, der C-terminal in dem sog. hydrophoben Finger endet.

Eine strukturelle Auffälligkeit des aliphatischen Kerns ist der aus 5 Methioninen gebildete „zipper“: ein Methionin befindet sich in H1, drei Methionine in H3 und ein weiteres Methionin in H5. Der auf Helix 5 folgende C-Terminus lässt sich in drei Bereiche unterteilen: eine flexible Schleife (AS 1047-1052), ein β -Faltblatt (AS 1053-1061) und den sogenannten hydrophoben Finger (AS 1062-1066).

Die ersten 4 Helices besitzen einen hohen Anteil basischer Aminosäurereste, nur Helix 5 hat sauren Charakter. Positive Ladungen sammeln sich besonders in zwei Regionen auf der Oberfläche der Domäne: Innerhalb des basischen Kragens, der das Bündel am extremen C-Terminus der Domäne

umfasst und so möglicherweise stabilisiert sowie in einer als „basische Leiter“ bezeichneten Region der Helix 3. Diese basischen Bereiche sind in Kombination mit den angesprochenen hydrophoben Regionen vermutlich von entscheidender Bedeutung für die Regulation Vinculins durch die Interaktion mit sauren Phospholipiden (siehe Kapitel 1.1.4).

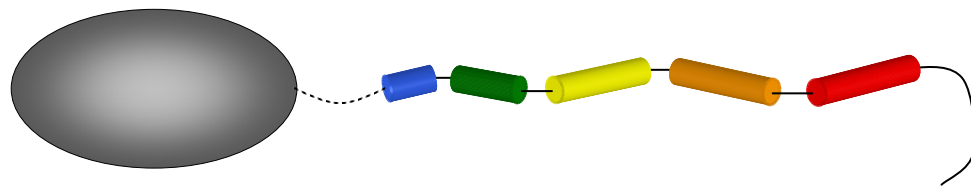
Diese Daten stimmen gut mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen überein (Beck, 1989; Winkler et al., 1996), die eine Vinculinschwanz-Länge von 19 nm und eine Unterteilung in vier Bereiche postulieren (vgl. Abbildung 2). Vermutlich entsprechen diese elektronendichten Bereiche den Helices der Vinculin-Schwanzdomäne, wobei eine Helix durch den Vinculin-Kopf verdeckt worden sein könnte.

1.1.3 Liganden

Vinculin ist ein Multi-Ligandenprotein, welches mit einer Vielzahl struktureller und regulatorischer Proteine, bzw. Moleküle interagieren kann (Abbildung 4). Zu den Vinculin-Kopf-Liganden zählen Talin (Belkin & Koteliansky, 1987; Burridge & Mangeat, 1984; Gilmore et al., 1992; Jones et al., 1989; Otto, 1983;), α -Actinin (Kroemker et al., 1994; Wachstock et al., 1987) und α -Catenin (Watabe-Uchida et al., 1998; Weiss et al., 1998), die an der Rekrutierung Vinculins in Aktin-assoziierte Adhäsionskomplexe von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen beteiligt sind. Interaktionspartner der prolinreichen Nackenregion sind die SH3-Domänen-Proteine Vinexin (Kioka et al., 1999), Ponsin (Mandai et al., 1999) und ArgBP2 (Kawabe et al., 1999) sowie das in die lokale Aktindynamik involvierte Aktin-bindende und -nukleierende Protein VASP, das über seine EVH1-Domäne an das FP₄-Motiv von Vinculin bindet (Brindle et al., 1996; Reinhard et al., 1996). Auch eine Assoziation des Arp2/3-Komplexes mit der prolinreichen Region wurde beschrieben (DeMali et al., 2002). Zu den Liganden der Vinculin-Schwanzdomäne zählen F-Aktin (Gilmore & Burridge, 1996; Menkel et al., 1994) und Paxillin (Turner et al., 1990; Wood et al., 1994). Darüber hinaus kann Vinculin intermolekulare Wechselwirkungen mit anderen Vinculinmolekülen (Belkin & Koteliansky, 1987; Milam, 1985; Molony & Burridge, 1985; Otto, 1983) sowie intramolekulare Kopf-Schwanz-Wechselwirkungen (Gilmore & Burridge, 1996; Johnson & Craig, 1994; Johnson & Craig, 1995b) eingehen.

Vinculin interagiert jedoch nicht nur mit Proteinen, sondern besitzt wie zahlreiche weitere Aktin-bindende Proteine (Übersicht in Sechi & Wehland, 2000) auch Bindungsstellen für saure Phospholipide (Burn & Burger, 1987; Ito et al., 1983; Niggli et al., 1986).

Vinculin bindet bevorzugt an negativ geladene Phospholipide (Palmitinsäuren, Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin), nicht jedoch an neutrale Phospholipide wie Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin (Fukami et al., 1994; Ito et al., 1983; Johnson & Craig, 1995a). Die Dissoziationskonstanten liegen zwischen K_d $1,2 \cdot 10^{-6}$ M und $5,3 \cdot 10^{-6}$ M (Isenberg & Niggli, 1998).

**Kopfdomäne**

Talin
 α -Actinin
 α -Catenin
 Vinculin-Schwanz

PRR

VASP (FP₄)
 Vinexin
 Ponsin
 ArgBP2
 Arn2/3-Komplex

Schwanzdomäne

F-Aktin
 PIP₂
 Paxillin
 Vinculin-Kopf
 Raver1
 Dimerisierung

Abbildung 4: Schematische Darstellung des entfalteten Vinculin-Moleküls und Zuordnung von Liganden zu drei Bereichen des Proteins

Vinculin besteht aus einer großen globulären Kopfdomäne, einer flexiblen prolinreichen Halsregion (PRR) und einer Schwanzdomäne. Die Schwanzdomäne besteht aus fünf α -Helices, die farblich entsprechend der in Abbildung 3 gezeigten Kristallstruktur hervorgehoben sind. Die Vinculin-Kopfdomäne ist vereinfachend unter Vernachlässigung von bisher bekannten strukturellen Daten als graues Oval dargestellt. Liganden der Kopf- und Schwanzdomäne sowie der prolinreichen Scharnierregion sind unter den jeweiligen Regionen aufgeführt.

1.1.4 Saure Phospholipide als Regulatoren Vinculins

Vergleichende Untersuchungen an intaktem Vinculin und den isolierten Kopf-, bzw. Schwanzfragmenten zeigten, dass diese Fragmente wesentlich effizienter mit ihren Protein- oder Phospholipid-Liganden interagieren als Gesamt-Vinculin. Dies gilt sowohl für Kopf-bindende Liganden wie Talin (Gilmore & Burridge, 1996; Johnson & Craig, 1994) und α -Actinin (Kroemker et al., 1994) als auch für die über die Schwanzdomäne vermittelte F-Aktin-Bindung (Johnson & Craig, 1995b) und Oligomerisierung (Hüttelmaier et al., 1998). Viele der oben genannten Bindungsstellen scheinen daher nicht immer frei zugänglich zu sein. Es zeigte sich tatsächlich, dass durch eine intramolekulare Wechselwirkung zwischen Kopf- und Schwanzdomäne Ligandenbindungsstellen in beiden Domänen maskiert werden können (Abbildung 5). Die Kopf-Schwanz-Interaktion ist mit einer Dissoziationskonstante von 50 nM hoch affin (Weekes et al., 1996) und somit ein wesentliches regulatives Element der Vinculinfunktion.

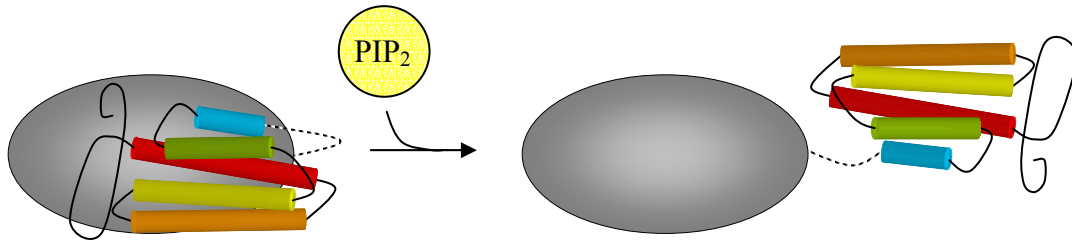


Abbildung 5: Die Schwächung der Kopf-Schwanz-Interaktion durch Bindung saurer Phospholipide

In Abwesenheit saurer Phospholipide (PIP_2) bindet das helikale Bündel der Schwanzdomäne an den Vinculinkopf. Diese geschlossene Konformation wird durch PIP_2 gelöst, so dass Kopf- und Schwanzdomäne nun frei zugänglich vorliegen und mit ihren Liganden (siehe Abbildung 4) in Wechselwirkung treten können. Darstellung der Vinculin-Kopfdomäne wie in Abb. 4, Schwanzdomäne nach Abb. 3.

Die Kopf-Bindungsstelle wurde innerhalb der Schwanzdomäne biochemisch auf einen kurzen Bereich der Helix 5 der Vinculin-Schwanzdomäne (Aminosäuren 1029-1036) eingegrenzt, die Schwanzbindungsstelle in der Kopfdomäne wurde im Bereich der Aminosäuren 1-285 lokalisiert (Weekes et al., 1996). In einer jüngeren Studie wurden die Aminosäuren 181-226, ein basischer Bereich innerhalb der sauren Kopfdomäne, als Schwanzbindungsstelle identifiziert, die Kopfbindungsstelle wurde auf die Aminosäuren 1009-1066 eingegrenzt (Miller et al., 2001). Die Kopf-Schwanz-Wechselwirkung wird vermutlich durch die bereits erwähnte hochflexible Scharnier- bzw. Gelenkregion ermöglicht, wobei die eigentliche Interaktion über gegensätzlich geladene Kontaktregionen innerhalb beider Domänen sowie durch hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet wird (Miller et al., 2001).

Als Regulatoren der Kopf-Schwanz-Interaktion wurden saure Phospholipide, insbesondere Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) ermittelt (Gilmore & Burridge, 1996; Johnson & Craig, 1995b; Weekes et al., 1996). Sie inhibieren die Kopf-Schwanz-Interaktion (Abbildung 5) und legen so die Bindungsstellen Vinculin-spezifischer Liganden (Abbildung 4) sowie Phosphorylierungsstellen frei. Es wird diskutiert, dass die offene Konformation Vinculins einerseits durch die Interaktion der Kopfdomäne mit dem Strukturprotein Talin stabilisiert werden könnte, da innerhalb der Kopfdomäne die Bindungsstellen für die Interaktion mit der Vinculin-Schwanzdomäne und für Talin überlappen (Bass et al., 2002; Gilmore et al., 1992; Gilmore et al., 1993; Jones et al., 1989; Miller et al., 2001; siehe auch Abbildung 4).

Andererseits könnte die offene Konformation Vinculins auch durch Phosphorylierung stabilisiert werden (Siliciano & Craig, 1987). Die Öffnung des Proteins durch saure Phospholipide legt Phosphorylierungsstellen für die lipidabhängige Proteinkinase C frei (Schwienbacher et al., 1996),

welche kürzlich auf die Aminosäuren S1033 und S1045 innerhalb der Helix 5 der Vinculin-Schwanzdomäne lokalisiert werden konnten (Ziegler et al., 2002).

Eine gemeinsame Eigenschaft von Proteindomänen, die an negativ geladene Lipidmembranen binden, ist ein hydrophobes Element, das in die Lipidmembran inseriert und eine basische Oberfläche, die die Interaktion mit den sauren Lipidkopfgruppen vermittelt (Misra & Hurley, 1999; Sigal et al., 1994). Die Vinculin-Schwanzdomäne weist zwei Bereiche auf, die diese Bedingungen erfüllen: Zum einen ist ein Bereich, der die hydrophobe und basische Helix 3 (siehe Kapitel 1.1.2) umfasst, in der Lage an saure Phospholipide zu binden (Bakolitsa et al., 1999; Hüttelmaier et al., 1998; Johnson et al., 1998; Tempel et al., 1995), zum anderen bindet die Vinculin-Schwanzdomäne über den hydrophoben Finger, der in direkter räumlicher Nähe des basischen Kragens liegt, an Vesikel saurer Phospholipide (Bakolitsa et al., 1999). In unabhängigen Studien wurde bereits vor der Auflösung der Kristallstruktur der Vinculin-Schwanzdomäne die Präsenz zweier Lipidbindungsstellen postuliert (Hüttelmaier et al., 1998; Johnson et al., 1998; Tempel et al., 1998; siehe auch Abbildung 7).

Im Gegensatz zu dem ursprünglich aufgestellten Modell, demzufolge die Aktivierung von Vinculin in einem Schritt erfolgt, muss heute von einer 2-Schritt-Aktivierung des Proteins durch saure Phospholipide ausgegangen werden, denn die Bindung saurer Phospholipide an die Vinculin-Schwanzdomäne nimmt nicht nur Einfluss auf die Konformation des Gesamtproteins, sondern wahrscheinlich auch auf die Konformation der Schwanzdomäne:

Die Inkubation mit sauren Phospholipiden führt zu einer erhöhten Proteasesensitivität der Vinculin-Schwanzdomäne, was - ähnlich wie bei dem strukturhomologen Protein Apolipoprotein E (Breiter et al., 1991; Wilson et al., 1991) - eine durch Bindung induzierte Konformationsänderung nahelegt (Bakolitsa et al., 1999; Lu et al., 2000; Raussens et al., 1998). Darüber hinaus können saure Phospholipide eine Oligomerisierung der Vinculin-Schwanzdomäne induzieren (Hüttelmaier et al., 1998). Bereits frühe elektronenmikroskopische Untersuchungen ließen solche Schwanz-Schwanz-Interaktionen vermuten (Milam, 1985; Winkler et al., 1996). Neuere Studien an rekombinanten Proteinen belegen die intermolekulare Assoziation mehrerer Vinculin-Schwanzdomänen und zeigen zwei Oligomerisationsbereiche auf (AS893-985 sowie AS1016-1066, Hüttelmaier et al., 1997). Diese Bereiche liegen innerhalb der Helices 3 und 5 der Vinculin-Schwanzdomäne (siehe Abbildung 7). In der Bündelkonformation (siehe Kapitel 1.1.2) scheinen diese Oligomerisierungsbereiche jedoch strukturell maskiert vorzuliegen, da in diesem Zustand nur wenig Protein dimerisiert, bzw. oligomerisiert - das Gleichgewicht liegt eher auf Seiten der monomeren Form. Inkubation der rekombinant hergestellten Schwanzdomäne mit sauren Phospholipiden bewirkt wahrscheinlich eine Konformationsänderung der Vinculin-Schwanzdomäne. Dadurch werden zuvor verborgene Bereiche freigelegt, welche eine Dimerisierung der Schwanzdomäne ermöglichen (Hüttelmaier et al., 1998; siehe auch Abbildung 6).

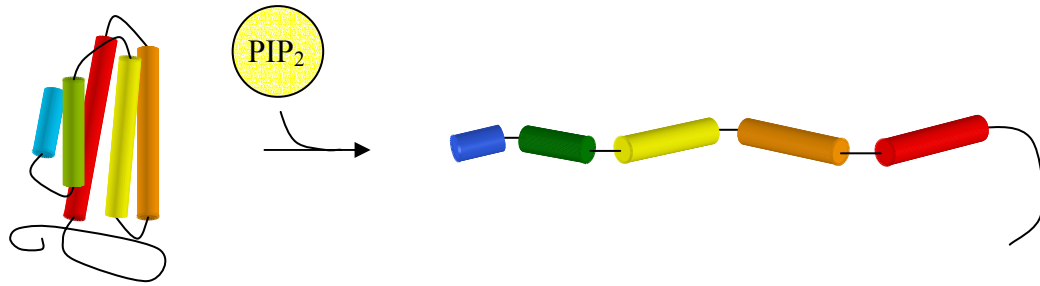


Abbildung 6: Schematische Darstellung der vermuteten PIP_2 -induzierten Konformationsänderung der Vinculin-Schwanzdomäne

Saure Phospholipide (PIP_2) binden an den extremen C-Terminus (hydrophober Finger, basischer Kragen), und an die hydrophobe und basische α -Helix 3 (gelb) der Vinculin-Schwanzdomäne und bewirken eine Öffnung des helikalen Bündels, was sich in erhöhter Sensitivität gegenüber Proteasen manifestiert. Farbgebung der α -Helices nach Bakolitsa et al., 1999.

1.1.5 Vinculin und die Bindung an F-Aktin

Vor der Entdeckung der regulativen intramolekularen Kopf-Schwanz-Wechselwirkung und deren Einfluss auf die Interaktion mit Liganden (siehe Kapitel 1.1.4) war die direkte Bindung von Vinculin an Aktinfilamente umstritten (Otto, 1986; Wilkins & Lin, 1982; Wilkins & Lin, 1986). Sie konnte *in vitro* erstmals durch die F-Aktin-Bündelungseigenschaften von Vinculin nachgewiesen werden (Jockusch & Isenberg, 1981; Jockusch & Isenberg, 1982). Die F-Aktin-Bindungsstelle wurde zunächst auf den Vinculin-Schwanz (AS 893-1016) eingegrenzt (Menkel et al., 1994), in späteren Studien wurden zwei F-Aktin-Bindungsstellen identifiziert: AS 940-1012 und AS 1012-1066 (Johnson & Craig, 1995b), bzw. AS 893-985 und AS 1016-1066 (Hüttelmaier et al., 1997). Diese *in vitro* Daten konnten *in vivo* durch ektopische Expression der Vinculin-Schwanzdomäne an Mitochondrien und eine dadurch hervorgerufene Rekrutierung von F-Aktin bestätigt werden (Bubeck et al., 1997). Bezogen auf die Kristallstruktur der Vinculin-Schwanzdomäne liegen die F-Aktinbindungsstellen in den Helices 3 und 5 und überlappen somit sowohl mit den Oligomerisierungsregionen als auch partiell mit den Bindungsstellen für saure Phospholipide (siehe Abbildung 7).

Durch chemische Vernetzung („chemical crosslinking“) konnte in *in vitro*-Experimenten mit rekombinant hergestellten Vinculin-Schwanzdomänen gezeigt werden, dass neben PIP_2 auch F-Aktin die Dimerisierung der Vinculin-Schwanzdomäne induzieren kann (Johnson & Craig, 2000). Die Bindung von Aktinfilamenten an die Vinculin-Schwanzdomäne erhöht ebenfalls deren Sensitivität gegenüber Proteasen und induziert daher vermutlich ähnlich wie bei der Bindung saurer Phospholipide Konformationsänderungen in der Vinculin-Schwanzdomäne (Bakolitsa et al., 1999; Johnson & Craig,

2000), die eine Exposition der zuvor verborgenen Dimerisierungsregionen zur Folge haben. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sich die durch F-Aktin und saure Phospholipide induzierten Oligomere biochemisch unterscheiden (Johnson & Craig, 2000): Entstehen bei Inkubation mit F-Aktin hauptsächlich Dimere, so findet man in Gegenwart saurer Phospholipide hauptsächlich Dimere und Trimere, jedoch auch höhere Oligomere wie Tetramere und Pentamere (Hüttelmaier et al., 1998; Johnson & Craig, 2000). Während die Oligomerisierung der Vinculin-Schwanzdomäne sowohl durch saure Phospholipide (Hüttelmaier et al., 1998) als auch durch F-Aktin (Johnson & Craig, 2000) stimuliert wird, scheint die simultane Bindung von PIP_2 und Aktin ausgeschlossen zu sein. Durch das partielle Überlappen der jeweiligen Bindungsregionen (siehe Abbildung 7) kommt es zu einer kompetitiven Hemmung der F-Aktin-Bindung durch PIP_2 (Steimle et al., 1999).

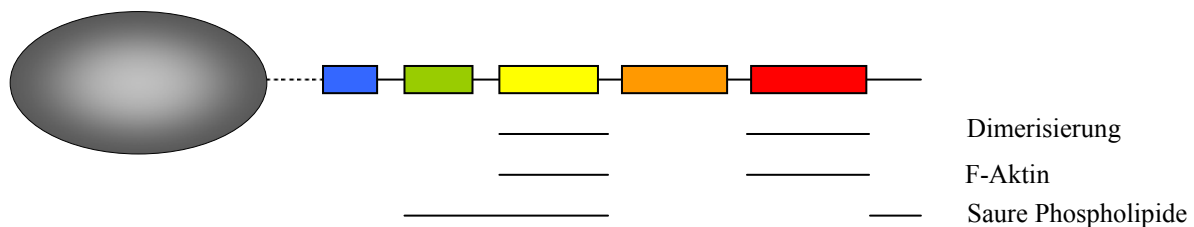


Abbildung 7: Interaktionsbereiche der Vinculin-Schwanzdomäne, die die Bindung an Aktin und saure Phospholipide sowie die Dimerisierung vermitteln

Die Schwanzdomäne ist schematisch in 5 Abschnitte unterteilt, die den 5 Helices der Kristallstruktur entsprechen (Farbegebung entsprechend Abbildung 3). Das überstehende Ende hinter Helix 5 (rot) symbolisiert basischen Kragen und hydrophoben Finger am C-Terminus der Vinculin-Schwanzdomäne. Die miteinander überlappenden Interaktionsbereiche sind unter der Abbildung als Linien dargestellt.

Die Bindung der Vinculin-Schwanzdomäne an F-Aktin hat eine drastische Reorganisation der Aktinfilamente zur Folge, denn die rekombinante Vinculin-Schwanzdomäne induziert *in vitro* die Bildung dicker Aktinfilamentbündel (Korneeva & Jockusch, 1996; Rüdiger et al., 1998). Das Vorkommen zweier F-Aktin-Bindungsstellen innerhalb der Schwanzdomäne führte anfangs zu der Vermutung, dass ein Vinculinmolekül mehrere Aktinfilamente binden und so zur Bildung dieser Bündel führen könnte. Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass in einem Vinculinmolekül nur eine der Aktinbindungsstellen direkt mit Aktinfilamenten interagiert, während die andere in die Dimerisierung involviert ist (Hüttelmaier et al., 1997).

1.1.6 Vinculin in der Zelle – ein Modell

Für die Einbindung der nahezu ausschließlich aus *in vitro*-Untersuchungen stammenden Befunde zur Regulation von Vinculin in zelluläre Adhäsionsprozesse wurden verschiedene Modelle aufgestellt, deren Detailliertheit sich in den letzten Jahren insbesondere durch die Aufklärung der Kristallstruktur der Vinculin-Schwanzdomäne immer weiter verbessert hat. Im Folgenden soll kurz die gegenwärtige Vorstellung der Funktion von Vinculin *in vivo* im Rahmen eines Modells erläutert werden (Abbildung 8).

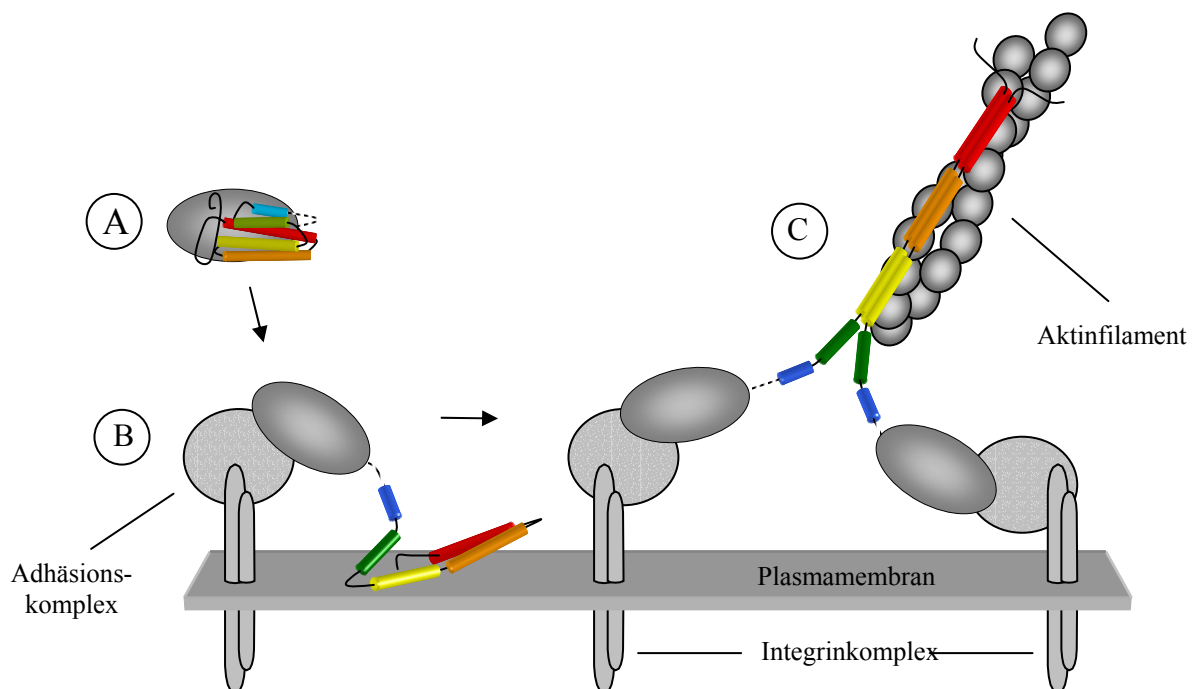


Abbildung 8: Hypothetisches und stark vereinfachtes Modell der Vinculin-Aktivierung bei dem Aufbau von Adhärenzverbindungen (modifiziert nach Bakolitsa et al., 1999 und Johnson & Craig, 2000)

A) Vinculin liegt cytoplasmatisch in einer geschlossenen Konformation vor, die Ligandenbindungsstellen sind unzugänglich. B) Vinculin wird an der Plasmamembran durch Interaktion mit sauren Phospholipiden geöffnet und bindet an Integrin-assoziierte Proteine; die Schwanzdomäne entfaltet sich. C) Phospholipasen lösen die Bindung an Phospholipide und machen die Vinculin-Schwanzdomäne zugänglich für die Bindung von Aktinfilamenten. Darstellung der Vinculin-Kopfdomäne wie in Abb. 4, Schwanzdomäne nach Abb. 3.

In Abwesenheit saurer Phospholipide liegt Vinculin innerhalb eines cytoplasmatischen „Pools“ in einer geschlossenen, für Liganden unzugänglichen Konformation vor (BurrIDGE & FERAMISCO, 1980). In dieser Konformation stabilisiert die Bindung des Kopfes an den Schwanz vermutlich die

Konformation des helikalen Bündels der Vinculin-Schwanzdomäne (Bakolitsa et al., 1999; siehe auch Abbildung 8 A). Die Bindung membranständiger Ansammlungen saurer Phospholipide führt zu einer Lösung der Kopf-Schwanz-Interaktion des Vinculinmoleküls (Gilmore & Burridge, 1996) und einer Entfaltung der Schwanzdomäne (Bakolitsa et al., 1999). Dabei inseriert vermutlich der extreme C-Terminus des Proteins in die Membran (Johnson et al., 1998) und hydrophobe und basische Regionen der Schwanzdomäne assoziieren mit den negativ geladenen Kopfgruppen saurer Phospholipide (Bakolitsa et al., 1999). Die Entfaltung des Proteins führt zur Exposition von Bindungsstellen für verschiedene Proteine des cytoplasmatischen Adhäsionskomplexes (siehe Abbildung 8 B), unter anderem für bereits vorhandenes Talin (Bendori et al., 1989; Moulder et al., 1996). Die Bindung an Talin sowie vermutlich die Phosphorylierung der Schwanzdomäne halten das Protein geöffnet (Bass et al., 2002; Siliciano & Craig, 1987); dieses kann nach einem Lösen der Assoziation mit der Membran unter Beteiligung von Phospholipasen an Aktinfilamente binden (Steimle et al., 1999; siehe auch Abbildung 8 C).

Sowohl saure Phospholipide als auch Aktinfilamente können die Dimerisierung der Vinculin-Schwanzdomäne verursachen (Hüttelmaier et al., 1998; Johnson & Craig, 2000). Es ist daher unklar, wie die Dimerisierung des Gesamtproteins in das obige Modell einzubauen ist. Denkbar wäre dies in der Nähe der Zellmembran oder aber erst später bei der Interaktion von Vinculin mit Aktinfilamenten. Spekulationen zu diesem Thema finden sich in Kapitel 4.4.3.

1.2 Metavinculin

1.2.1 Aufbau und Molekularstruktur

Vinculin besitzt eine muskelspezifisch exprimierte Isoform, Metavinculin (Siliciano & Craig, 1982), das aus 1134 Aminosäuren (Maus, Mensch, Schwein) besteht und ein Molekulargewicht von 123 kDa aufweist. Metavinculin entsteht durch alternatives Spleißen der Vinculin-prä-mRNA (Byrne et al., 1992). Beim Menschen liegt das Vinculingen auf Chromosom 10 (Mulligan et al., 1992; Weller et al., 1990). Es umfasst einen Bereich von mehr als 75 kb, der 22 Exons und einen vergleichsweise großen (1,8 kb) untranslatierten 3'-Bereich enthält (Moiseyeva et al., 1993). Analysen der Vinculin-mRNA ergaben, dass die alternativen Spleißvorgänge auf Exon 19 beschränkt sind, welches für den Metavinculin-spezifischen Einschub codiert (Byrne et al., 1992).

Dies resultiert darin, dass sich Metavinculin lediglich durch einen Einschub zwischen den α -Helices 1 und 2 der Vinculin-Schwanzdomäne von Vinculin unterscheidet (Gimona et al., 1988; siehe auch Abbildung 9). Die Größe des Metavinculin-Einschubs variiert speziesabhängig: Bei Maus, Mensch

und Schwein umfasst er 68 Aminosäuren, beim Huhn 69 und im Krallenfrosch *Xenopus* sogar 79 Aminosäuren.

Bisher konnte die Kristallstruktur der Metavinculin-Schwanzdomäne noch nicht aufgeklärt werden. Aufgrund von Computeranalysen wird jedoch für den Einschub eine aus drei α -Helices bestehende Struktur vorhergesagt (siehe Abbildung 10). Der größten Variabilität unterliegt der Metavinculin-Einschub dabei innerhalb der ersten Helix, wohingegen die Helices 2 und 3 bei allen bisher untersuchten Spezies hochkonserviert sind (Koteliansky et al., 1992; Strasser et al., 1993).

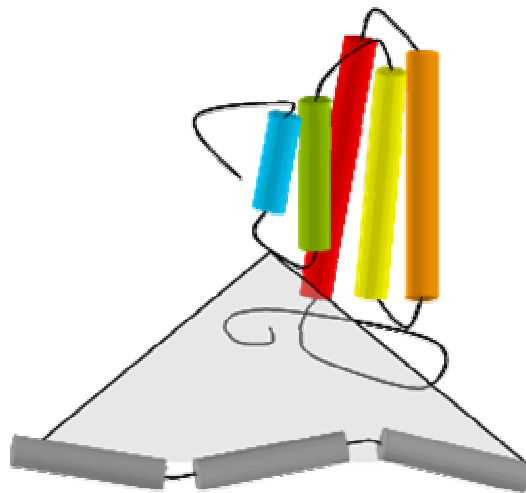


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Position des Metavinculin-Einschubs in der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne

Der Metavinculin-Einschub befindet sich zwischen den α -Helices 1 und 2 der Vinculin-Schwanzdomäne. Es ist vermutlich in drei α -Helices gefaltet, von denen die ersten beiden sauren Charakter aufweisen, Helix 3 basischen. Die Vinculin-Schwanzdomäne ist schematisch nach Bakolitsa et al., 1999 dargestellt, die Farbgebung entspricht der in jener Arbeit verwendeten (vgl. Abbildung 3).

Mit seinen 68-79 Aminosäuren macht der Metavinculin-Einschub etwa ein Viertel und somit einen relativ großen Anteil der Metavinculin-Schwanzdomäne aus und verändert das Molekulargewicht der Vinculin-Schwanzdomäne von 27 auf 32 kDa. Darüber hinaus wird der isoelektrische Punkt entscheidend verändert und damit wahrscheinlich auch die biochemischen Eigenschaften der Schwanzdomäne. Die ersten beiden α -Helices des Metavinculin-Einschubs besitzen stark sauren Charakter, α -Helix drei ist eher basisch. Dementsprechend ist der für den Metavinculin-Einschub kalkulierte isoelektrische Punkt stark sauer und liegt in einem Bereich von 3,68 (Huhn) bis 4,21 (Mensch). Der saure Metavinculin-Einschub senkt den isoelektrischen Punkt der murinen Schwanzdomäne (AS 858-1066) von 10,6 bei Vinculin auf 6,64 bei Metavinculin.

In der Aminosäuresequenz wird der Metavinculin-Einschub zu beiden Seiten von einem KWSSK-Motiv flankiert, von denen eines auch im Vinculin auftritt. Es enthält eine Protease-sensitive Stelle für Papain und die V8-Endoprotease. Ferner existiert wie bei Vinculin auch die V8-Spaltstelle in der prolinreichen Nackenregion. Durch die zweite Schnittstelle innerhalb der Metavinculin-Schwanzdomäne lässt sich Metavinculin jedoch anders als Vinculin durch die V8-Protease nicht in eine funktionelle Kopf- und Schwanzdomäne spalten (Gimona et al., 1988).

1.2.2 Vinculin und Metavinculin – Gemeinsamkeiten und Unterschiede

1.2.2.1 Expression und Lokalisation

Während Vinculin in vielen Organismen ubiquitär exprimiert wird, ist die Expression von Metavinculin auf Muskelgewebe beschränkt (Feramisco et al., 1982). Die Expression von Metavinculin steht offenbar in enger Beziehung zur Differenzierung von Muskelzellen (Saga et al., 1985): Es wird in Muskelgewebe des Huhns ab Tag 8 der Embryonalentwicklung bis Tag 14 in steigendem Maße exprimiert, während die Expression von Vinculin bereits viel früher in der Embryonalentwicklung beginnt und in dieser Zeit keinen Änderungen unterliegt (Duband & Thiery, 1990; Evans et al., 1990; Saga et al., 1985).

Im adulten Organismus sind die höchsten Expressionsraten in glatter Muskulatur zu verzeichnen, in der Metavinculin je nach Gewebe bis zu etwa 40 % des Vinculinproteins ausmachen kann (Belkin et al., 1988b). In Skelettmuskelgewebe wurde keine, bzw. eine extrem geringe Expression von Metavinculin nachgewiesen (Belkin et al., 1988a; Belkin et al., 1988b; Feramisco et al., 1982). Für Herzmuskelgewebe existieren widersprüchliche Ergebnisse: Eine Arbeitsgruppe konnte in Herzmuskelgewebe wie in Skelettmuskelgewebe des Huhns lediglich Spuren von Metavinculin nachweisen (Feramisco et al., 1982), wohingegen nach den Ergebnissen einer anderen Gruppe Metavinculin mit bis zu 18 % des Gesamt-Vinculinproteins in humanem Herzmuskelgewebe exprimiert wird (Belkin et al., 1988b). Eine jüngere Arbeit liefert Hinweise darauf, dass eine besondere mechanische Beanspruchung die verstärkte Expression von Metavinculin spezifisch in schnellen Skelettmuskeln bewirkt (Chopard et al., 2002).

Die subzelluläre Lokalisation von Metavinculin wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten humaner Gewebe untersucht. Lichtmikroskopisch wurde gezeigt, dass Vinculin und Metavinculin in denselben, zellspezifischen Adhäsionsstrukturen lokalisieren (Belkin et al., 1988a; Glukhova et al., 1986): In Herzmuskelgewebe wurde Metavinculin ebenfalls an Glanzstreifen und Costameren (Belkin et al., 1988a) lokalisiert, in Glattmuskelgewebe konnte Metavinculin in den „dense plaques“ nachgewiesen werden (Belkin et al., 1988a).

Ob es dort zu einer direkten Interaktion beider Isoformen kommt oder inwieweit die molekulare Architektur dieser Strukturen durch Metavinculin verändert wird, ist bisher nicht bekannt.

1.2.2.2 Liganden und Regulation

Da etwa 94 % der Aminosäuresequenz von Vinculin und Metavinculin identisch sind, ist anzunehmen, dass die meisten Vinculinliganden in ähnlicher Weise auch an Metavinculin binden. Durch „overlay“-Techniken konnte dies für die Kopfliganden Talin und α -Actinin bereits gezeigt werden (Belkin & Kotliansky, 1987). Der stark saure Charakter des Metavinculin-Einschubs könnte jedoch die räumliche Anordnung des helikalen Bündels der Schwanzdomäne beeinflussen und sich möglicherweise auch modulierend auf Wechselwirkungen insbesondere im Bereich der Schwanzdomäne auswirken.

Der erste Hinweis auf einen modulativen Einfluss des Metavinculin-Einschubs wurde mit *in vitro*-Untersuchungen zur Organisation von Aktinfilamenten durch die Vinculin-, bzw. Metavinculin-Schwanzdomäne erbracht (Rüdiger et al., 1998): Inkubation der Vinculin-Schwanzdomäne mit filamentösem Aktin bewirkte die Bildung dicker F-Aktin-Bündel, wohingegen die Inkubation der Metavinculin-Schwanzdomäne mit F-Aktin zur Ausbildung von F-Aktin-Netzwerken führte.

Auch das Fehlen Metavinculin-spezifischer Liganden deutet auf eine modulatorische Funktion des Metavinculin-Einschubs auf die Interaktion mit Liganden der Vinculin-Schwanzdomäne hin. Ein weiteres Beispiel für einen modulatorischen Einfluss des Metavinculin-Einschubs ist das „dual compartment“-Protein Raver1. Raver 1 wurde mittels eines Yeast-two-hybrid-Screens als Ligand der Metavinculin-Schwanzdomäne in einer embryonalen Genbank entdeckt (Hüttelmaier et al., 2001). Es bindet auch an die Vinculin-Schwanzdomäne, jedoch mit deutlich geringerer Affinität. Die Bedeutung des Proteins Raver1 sowie die Funktion der Interaktion mit (Meta)Vinculin sind bisher unbekannt. Durch eine vermutete Bindung von Raver1 an RNA könnte dieses Protein ein Bindeglied zwischen RNA-Metabolismus und dem Mikrofilamentsystem darstellen. Die gegenüber Vinculin stärkere Bindung der muskelspezifischen Isoform Metavinculin und die Verbindung zu RNA-Prozessierung und -Lokalisation deuten darauf hin, dass Raver1 möglicherweise für die Differenzierung von Muskelzellen von Bedeutung ist und dass eine verstärkte Rekrutierung des Proteins in Adhäsionskomplexe durch Metavinculin begünstigt wird.

Untersuchungen in ^{32}P -markierten Primärzellen aus embryonalen Hühnchenmägen liefern Hinweise darauf, dass Metavinculin *in vivo* etwa achtmal stärker phosphoryliert werden kann als Vinculin (Siliciano & Craig, 1987). Welche Funktion aber eine zusätzliche Phosphorylierung innerhalb des Metavinculin-Einschubs hat und wo die Phosphorylierungsstellen liegen, ist noch unklar.

1.2.3 Funktion und Bedeutung

Bisher konnte die genaue zelluläre Funktion von Metavinculin noch nicht aufgeklärt werden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Metavinculin eine essentielle Rolle für die strukturelle Integrität und Funktion des Herzens spielt. Neben einer Vielzahl von Strukturproteinen, die an der Kraftübertragungsmaschinerie des Herzens beteiligt sind, wurde auch Metavinculin als ein Protein identifiziert, dessen Mutation oder Ausfall bei normaler Expression von Vinculin mit dem Auftreten vererbbarer dilatativer Cardiomyopathien korrelieren kann (Maeda et al., 1997; Olson et al., 2002). Dilatative Cardiomyopathie ist eine Erkrankung des Herzmuskels, die sich durch eine Beeinträchtigung der Herzkontraktion durch krankhafte Erweiterung des linken Ventrikels und eine Veränderung der Cardiocytenmorphologie auszeichnet (siehe Abbildung 11 A, B, D, E).

Bei an vererbbarer dilatativer Cardiomyopathie erkrankten Patienten konnten drei Mutationen innerhalb des Metavinculin-Einschubs identifiziert werden (Abbildung 10, Olson et al., 2002), jeweils eine in jeder der drei für den Metavinculin-Einschub vorhergesagten Helices (Abbildung 10): eine Substitution von Alanin durch Valin in Helix 1 (A934V), eine Deletion von Leucin in Helix 2 (Δ 955L) und ein Austausch von Arginin durch Tryptophan in Helix 3 (R975W).

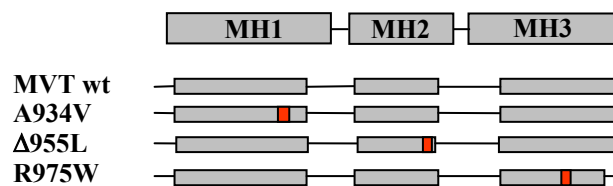


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Position dreier Mutationen innerhalb des Metavinculin-Einschubs, die mit dem Auftreten von dilatativer Cardiomyopathie korrelieren.

Der Metavinculin-Einschub ist vermutlich zu drei α -Helices gefaltet (graue Kästen, MH1-MH3: Metavinculin α -Helix 1-3). Bisher existieren drei mit dilatativer Cardiomyopathie korrelierende Mutationen innerhalb des Metavinculin-Einschubs. Sie sind am linken Bildrand angegeben. (Die Buchstaben symbolisieren Aminosäuren, die Zahl gibt die Position des Aminosäureaustausches innerhalb der Aminosäuresequenz von Vinculin an.) Die Position der Mutation ist jeweils innerhalb des Metavinculin-Einschubs rot hervorgehoben (nähere Erläuterung siehe Text).

Die entsprechenden rekombinant hergestellten Metavinculin-Schwanz-Mutanten wurden *in vitro* in Bezug auf ihre Interaktion mit und die Organisation von Aktinfilamenten charakterisiert (Olson et al., 2002). Es zeigte sich hierbei, dass bei den mutierten Proteinen im Vergleich zum Wildtypprotein die Bindung an F-Aktin unverändert, die Organisation der Filamente jedoch unterschiedlich stark modifiziert war. Interessanterweise korrelierte der Grad der unterschiedlichen F-Aktin-Organisation

mit der Stärke der Ausprägung der dilatativen Cardiomyopathie. Die drastischsten Veränderungen der F-Aktin-Organisation bewirkten die Substitutionen innerhalb der hochkonservierten Metavinculin-Helices 2 und 3 (siehe Abbildung 11 C, E). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine durch Mutation bedingte Funktionsbeeinträchtigung von Metavinculin mit der *in vitro* beobachteten differentiellen Organisation von Aktinfilamenten durch die entsprechende Schwanzdomäne assoziiert ist, was sich wiederum *in situ* in einer unterschiedlichen Morphologie der Glanzstreifen und *in vivo* in der Ausprägung der dilatativen Cardiomyopathie manifestiert (siehe Abbildung 11).

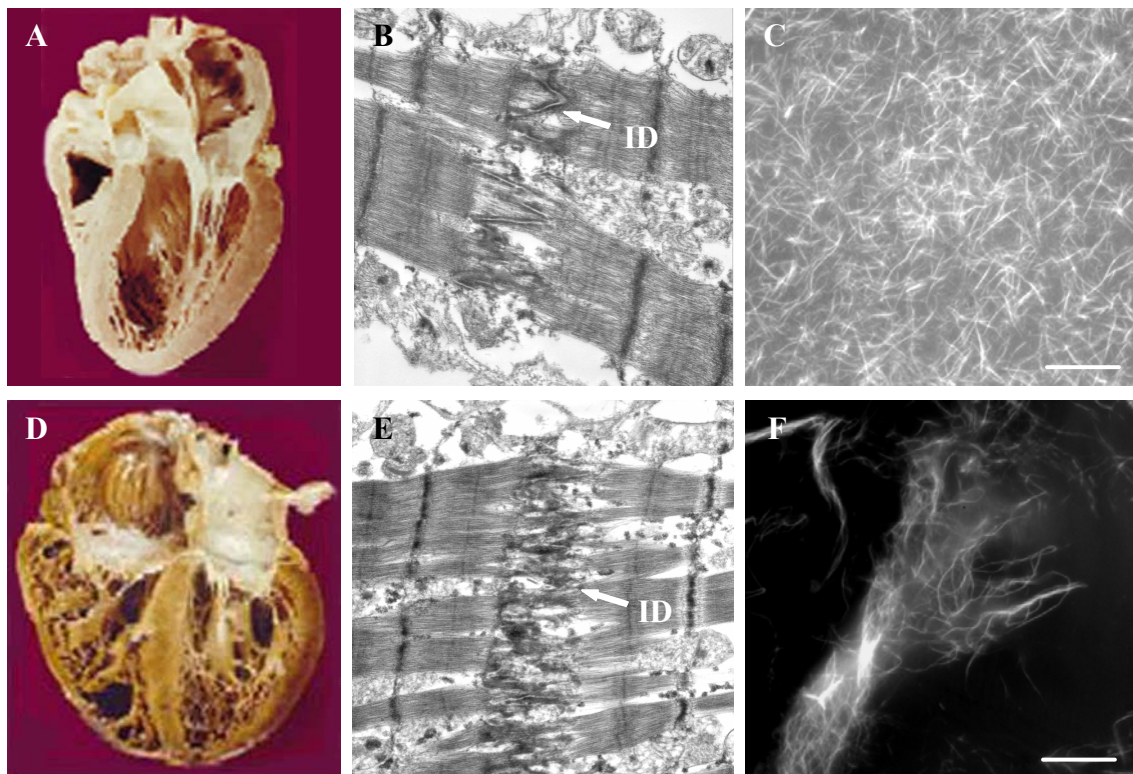


Abbildung 11: Vermutete Auswirkung der Mutation Metavinculins auf die Morphologie des Herzens, bzw. der Herzmuskelzellen und die Organisation von Aktinfilamenten

Der Austausch von Arginin zu Tryptophan in Helix 3 des Metavinculin-Einschubs korreliert beim Menschen mit dilatativer Cardiomyopathie (D) und äußert sich histologisch in zerrissenen Glanzstreifen (E) und *in vitro* in einer gegenüber dem Wildtypprotein veränderten Organisation von Aktinfilamenten (F). Zum Vergleich sind unter A-C die entsprechenden Darstellungen eines gesunden Menschen, bzw. Wildtypproteins gezeigt. ID: „Intercalated disc“. A, D entnommen aus Seidman & Seidman, 2001; B, C, E, F entnommen aus Olson et al., 2002

Derzeit existiert noch keine Metavinculin-„knockout“-Maus, möglicherweise ist aber auch der Herzphänotyp von Vinculin -/- Mäusen (Kapitel 1.1.1) darauf zurückzuführen, dass es in diesem Organ zu einem Ausfall beider Vinculin-Isoformen kommt.

1.3 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Metavinculin bezüglich seiner Funktion und biochemischen Eigenschaften zu charakterisieren. Bisherige Publikationen konnten herausstellen, dass Metavinculin ein für die Integrität und Funktion des Herzens essentielles Protein ist. Ansatzpunkte für ein Verständnis der Wirkungsweise beschränkten sich jedoch bisher auf eine differentielle Aktin-Organisation von Metavinculin-Mutanten, die mit einer dilatativen Cardiomyopathie korrelieren.

Ein experimenteller Ansatzpunkt war die Vorstellung, dass die besondere mechanische Beanspruchung und der zelluläre Aufbau des Herzmuskels die Expression bestimmter cytoskelettaler Proteine erfordern könnte, die die Verbindung von Zell-Zell-Kontakten zum Aktin-Cytoskelett verstärken. Metavinculin könnte ein Protein sein, das durch spezifische Interaktion mit weiteren Strukturproteinen des Kraftübertragungsapparates von Muskelzellen eine erhöhte mechanische Stabilität gewährleisten könnte. Bei Fehlen oder Mutation von Metavinculin könnte eine damit einhergehende Schwächung oder ein vollständiger Verlust von Interaktionen zu einer Schwächung der Verbindung von Transmembran-Verbindungsproteinen zum Aktin-Cytoskelett und somit zu den beobachteten Konsequenzen führen. Ein Bestandteil der vorliegenden Arbeit war daher die Suche neuer Metavinculin-spezifischer Liganden.

Darüber hinaus könnte Metavinculin andere Affinitäten gegenüber bekannten Liganden der Vinculin-Schwanzdomäne aufweisen. Ein weiterer Ansatzpunkt für die Untersuchung Metavinculins innerhalb dieser Arbeit war es daher, bekannte Vinculin-Liganden auf unterschiedliche Bindung von Vinculin und Metavinculin zu untersuchen. Besonderes Augenmerk sollte dabei unter anderem der Wechselwirkung mit Aktinfilamenten gelten, da diese zentraler Bestandteil des muskulären Kraftübertragungsapparates sind. Denkbar wäre beispielsweise eine zusätzliche Aktinbindungsaktivität des Metavinculin-Einschubs oder eine veränderte Affinität gegenüber Aktinfilamenten. Da der saure Metavinculin-Einschub in unmittelbarer Nähe einer Phospholipidbindungsstelle der Schwanzdomäne liegt, lag es nahe, die Regulation beider Proteine durch saure Phospholipide vergleichend zu analysieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geldokumentationsanlage:	Herolab GmbH, Wiesloch
Sequenzierer:	ABI Prism 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems
Zentrifugen:	Kühlzentrifuge J2-MC, Beckman Kühlzentrifuge 3K15, Sigma Tischzentrifuge Biofuge 13, Heraeus Tischzentrifuge 113, Sigma, Osterode am Harz
Airfuge:	Beckman
Thermocycler:	Thermocycler MJ Research, MWG
Photometer:	UV 1202, Shimadzu
ELISA-Reader:	MRX, Dynatech Lab.
Mikroskope:	Fluoreszenzmikroskop Axiophot, Zeiss Invertmikroskop Telafal 31, Zeiss
CCD-Kamera:	VarioCam Intas, PCO Computer Optics GmbH
Software:	Metamorph Systems, Adobe Photoshop 6.0, Microsoft Office XP, Lasergene DNASTar
Cryotom:	Frigocut 2800, Leica
Vortex Genie 2:	Bender & Hobein AG, Zürich
Inkubatoren:	Jouan EB280 Steri-Cult200, Forma Scientific, Ohio, USA Schüttelinkubator Certomat, Braun Biotech International
Ultraschallgerät:	Cell Disruptor B-12, Branson Sonic Power Co., Danbury, USA
Heizblock:	DRI-Block DB-2A, Techne
Heizrührer:	RCTbasic, IKA Labortechnik, Staufen
CD-Spektroskop:	Jasco Systems

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Difco (Hamburg), ICN (Eschwege) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Bezugsquelle für Enzyme waren, sofern nicht anders vermerkt, die Firmen New England Biolabs (Bad Schwalbach), Stratagene (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), Appligene (Heidelberg) und Promega (Mannheim).

2.1.3 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Die unter Kapitel 2.1.3.1 in Tabelle 1 aufgeführten Oligonukleotide tragen an ihrem Ende die Erkennungssequenz für entsprechende Restriktionsendonukleasen. Sie wurden hauptsächlich für Klonierungszwecke eingesetzt, teilweise jedoch auch für Sequenzierungen. Die Verwendung dieser Oligonukleotide für verschiedene Klonierungen ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Den unter 2.1.3.2 in Tabelle 3 aufgeführten Oligonukleotiden fehlt die Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme. Sie konnten daher ausschließlich für Sequenzierungen verwendet werden.

2.1.3.1 Klonierungsprimer

Tabelle 1: Aufstellung aller verwendeten Klonierungsoligonukleotide

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
1	VT828EcoR1sense	GGGAATTCGTGGCCAAGGTCAGAGAAGCC
2	VT858EcoR1sense	GGGAATTCCTGGCTCCTCCTAAGCCACCT
3	VT879BamH1sense	GGGATCCGAGAAGGATGAAGAGTTC
4	VT1066SalIreverse	GTCGACTTACTGGTACCAGGGAGTCTTTCTG
5	VH1EcoR1sense	GGAATTCATGCCAGTGTTTCATACGCG
6	VT851sense	GGAATTCCAGCTACGACTAAC
7	VH851reverse	CTTGCTAGACCATTTCCGAGC
8	FLAGBamH1sense	GATCCATGGACTACAAGGACGACGACAAGG
9	FLAGEcoR1reverse	AATTCCTTGTCGTCGTCCTTGTAGTCCATG
10	MVI68SalIreverse	GGTCGACCTACTTACTAGACCACTTGGA
11	VT942SalIreverse	GGTCGACCTAACCACTGCCCCCTTTACC
12	VT975SalIreverse	GGTCGACCTACTTATCTGTGCACTGCTTG
13	VT1012SalIreverse	GGTCGACCTAACTGATGTTGGTCCGGCCC
14	MVII1EcoR1sense	GGAATTCCTGGGTATCCAGCCGCTCAG
15	VT916EcoR1sense	GGAATTCGGCAATGACATCATTGCAGC
16	VT943EcoR1sense	GGAATTCACCAAGCGGGCACTTATTCAG
17	VT976EcoR1sense	GGAATTCCTGGATTAGAACCAATCTC
18	VT1052SalIreverse	GGTCGACCTAAGCATCTGTTCGGATTTTG
19	MVINNQsense	TTCCCCCTTAACATGGAAGACAATTACGAACCTCAGCTGCTG
20	MVINNQreverse	CAGCAGCTGAGGTTTCGTAATTGTCTTCCATGTTAGAGGGGAA
21	MVIQNSense	TTCCCCCTCAACATGCAAAACAATTACCAACCTCAGCTGCTG
22	MVIQNQreverse	CAGCAGCTGAGGTTTGTAATTGTTTTGCATGTTAGAGGGGAA

Tabelle 2: Auflistung der mit Hilfe der in Tabelle aufgelisteten Oligonukleotide hergestellten DNA-Konstrukte

Die Nummern in den Spalten Oligonukleotid 1/2 und Epitop-„tag“ beziehen sich auf die Nummerierung in Tabelle 1.

Konstrukt	Vektor	Oligonukleotid 1 (sense)	Oligonukleotid 2 (antisense)	Epitop-„tag“
VT ₈₂₈₋₁₀₆₆	pQE30	1	4	FLAG 6,7
MVT ₈₂₈₋₁₀₆₆	pQE30	1	4	FLAG 6,7
VT ₈₇₉₋₁₀₆₆	pQE30	3	4	-
MVT ₈₇₉₋₁₀₆₆	pQE30	3	4	-
MBP-VT ₈₅₈₋₁₀₆₆	pMal-C2	2	4	-
MBP-MVT ₈₅₈₋₁₀₆₆	pMal-C2	2	4	-
MV	pEGFP-c2	5, 6	4, 7	-
MV	pcDNA3	5, 6	4, 7	BiPro

2.1.3.2 Sequenzierungsprimer

Tabelle 3: Auflistung aller verwendeten Sequenzierungsoligonukleotide

Nr.	Name	Sequenz
1	T7	AATACGACTCACTATAG
2	Sp6	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC
3	VHseqsense1	TCTGTGAAGACAGGCCGAGAACTC
4	VHseqsense2	GTAGCCATGGCCAATATTCAGCCT
5	VHseqsense3	CATCTCTGACCCCGACCTGCAAAAG
6	VHseqsense6	CTGACCTCTAAACTAGGAGACTTG
7	VHseqsense7	TCGGTCAGGCTGCCATCCGTGGAC
8	VHseqsense8	GCAGGAAGCTATGACTCAAGAGGT
9	VHseqsense9	ATTCAGGCATCTGTGAAGACAGCC
10	VHseqsense10	GTAGCCATGGCCAATATTCAGCCT
11	VTseqreverse	CATTGGCTGGTTAATCACCTCACC
12	pQE30seqsense	GTCACGGGATAACAATTTACACAG
13	pQE30seqreverse	GTTCTGAGGTCATACTGGATCTATC

2.1.4 Genbanken

Für die „Yeast Two-Hybrid Screens“ wurden folgende Genbanken (Clontech) verwendet:

- „Mouse 17-day Embryo MATCHMAKER cDNA Library“
- „Human Heart MATCHMAKER cDNA Library“
- „Human Aorta MATCHMAKER cDNA Library“

2.1.5 Vektoren

Die Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* erfolgte mit dem Vektor pQE30 (Qiagen). Dieser Vektor beinhaltet einen durch IPTG induzierbaren Promotor, der die Expression des inserierten DNA-Fragmentes als Fusionsprotein mit sechs N-terminalen Histidinen bewirkt. Über diesen His-tag können die Fusionsproteine affinitätschromatographisch mittels einer Nickel-NTA-Matrix aufgereinigt werden.

In Einzelfällen wurde für die Expression rekombinanter Proteine auch der Vektor pmal-c2 (Invitrogen) eingesetzt. Auch in diesem Fall lässt sich die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG induzieren. Es entsteht jedoch ein Fusionsprotein, das am N-Terminus das sogenannte MBP („Maltose-Binding Protein“) aus *E.coli* trägt. Dies ermöglicht die Aufreinigung der entsprechenden Proteine über eine Amylosematrix.

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Proteinen in kultivierten eukaryotischen Zellen kam insbesondere der Vektor pEGFP-C2 (Clontech) zum Einsatz. Dieser Vektor trägt am 5'-Ende der MCS die Sequenz für das sogenannte GFP („Green Fluorescent Protein“). Nach dem Einbringen der Vektor-DNA in Zellen entsteht so ein Fusionsprotein, das N-terminal einen GFP-Fusionsanteil trägt. Dieser fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht und ermöglicht so die Untersuchung der Lokalisation des zu untersuchenden Proteins ohne den Einsatz spezifischer Antikörper.

Sollte ein Protein in kultivierten Zellen auf Lokalisation oder aber auch in Immunpräzipitationsexperimenten auf die Bildung von Komplexen untersucht werden, wurde zumeist der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3 verwendet. Zur Vereinfachung der Handhabung der zu untersuchenden Proteine wurde der Vektor zusätzlich mit einem sogenannten „tag“ versehen (siehe Kapitel 2.2.1.9). Dabei handelt es sich um kurze Nukleotidsequenzen, die im Leseraster vor die MCS des Vektors über Ligation eingebracht wurden. Diese kodieren für kurze Aminosäuresequenzen, die nach Einbringen des Vektors in die Zelle als N-terminaler Fusionsanteil des Proteins vorliegen und mit vorhandenen, spezifischen Antikörpern detektiert werden können. Verwendet wurde zum einen der sogenannte BiPro-„tag“, der aus einer kurzen Aminosäuresequenz des Proteins Profilin aus der Birke besteht. Dieser kann durch einen entsprechenden monoklonalen Antikörper (Rüdiger et al., 1997; Wiedemann et al., 1996) spezifisch detektiert werden. Andererseits kam auch der sogenannte FLAG-Epitop-„tag“ zum Einsatz, gegen den Antikörper käuflich zu erwerben sind (siehe Kapitel 2.1.6).

Für die Zwischenklonierung von PCR-Produkten wurden die Vektoren pCR-blunt (Invitrogen) oder pGemT-easy (Promega) eingesetzt.

„Yeast Two-Hybrid“ Analysen wurden mittels der Vektoren pGAD-T7 und pGBK-T7 (Clontech) durchgeführt. Eine genauere Beschreibung der Vektoren findet sich in Kapitel 2.2.2.16.

2.1.6 Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Antikörper und Toxine sind in den Tabellen 4 und 5 aufgeführt.

Tabelle 4: Zusammenfassung aller verwendeten Erstantikörper

EH: Eigene Herstellung (Sabine Buchmeier, AG Jockusch), WB: Western-Blot, IF: Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Antigen	Quelle	Organismus	Art	Verdünnung
α -FLAG (M2)	FLAG-Epitop-„tag“	Sigma	Maus	monoklonal	1:10000 (WB) 1:5000 (ELISA) 1:1000 (IF)
α -BiPro (4A6)	BiPro-Epitop-„tag“	EH	Maus	monoklonal	1:100 (WB)
6E3	Metavinculin-Einschub-Peptid	EH	Maus	monoklonal	Unverdünnt (IF), 1:10 (WB) Unverdünnt (ELISA)
2C6	Metavinculin-Schwanz	EH	Maus	monoklonal	Unverdünnt (IF), 1:10 (WB) Unverdünnt (ELISA)
α -Aktin	Aktin	Sigma	Kaninchen	polyklonal	1:200 (WB)
α -Tetra-His	His-„tag“	Qiagen	Maus	monoklonal	1:800 (WB)
hVin1	Vinculin-Kopf	Sigma	Maus	monoklonal	1:2000 (WB), 1:200 (IF)

Tabelle 5: Zusammenfassung aller eingesetzten Zweitantikörper und anderer fluorochromierter Agenzien

WB: Western-Blot, IF: Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Antigen	Quelle	Organismus	Verdünnung
α -mouse-IgG-HRP	Maus IgG	Sigma	Schaf	1:5000 (WB/ELISA)
α -rabbit-IgG-HRP	Kaninchen IgG	Sigma	Ziege	1:5000 (WB/ELISA)
α -mouse IgG-AP	Maus IgG	Sigma	Kaninchen	1:3500 (WB)
α -mouse IgG-FITC	Maus IgG	Sigma	Ziege	1:50 (IF)
α -mouse IgG-TRITC	Maus IgG	Sigma	Ziege	1:100 (IF)
α -rabbit IgG-Alexa Fluor 594	Kaninchen IgG	Molecular Probes	Ziege	1:300 (IF)
α -mouse IgG-Alexa Fluor 568	Maus IgG	Molecular Probes	Ziege	1:300 (IF)
α -rabbit IgG-Alexa Fluor 488	Kaninchen IgG	Molecular Probes	Ziege	1:250 (IF)
α -mouse IgG-Alexa Fluor 488	Maus IgG	Molecular Probes	Ziege	1:250 (IF)
Phalloidin-FITC	-	Sigma	-	1:50 (IF)
Phalloidin-TRITC	-	Sigma	-	1:100 (IF)

DMEM:

- 13,38 g DMEM (PAA Laboratories, Cölbe)*
- 1,5 g NaHCO₃*
- 10 ml 0,2 M N-Acetyl-L-Alanin-L-Glutamin (PAA Laboratories)*
- 100 ml FCS (Life Technologies)*
- auf 1 l mit H₂O_{dest.}*

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung Calciumchlorid-kompetenter Bakterien

Vor der Transformation müssen die Bakterienzellen für die Aufnahme von Fremd-DNA vorbereitet, kompetent gemacht werden. Die Kompetenz wird bei *E.coli* durch die Inkubation der Bakterien aus der frühen log-Phase in CaCl_2 erreicht.

Zur Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen wurden 100 ml LB-Medium im Verhältnis 1:50 mit einer Übernachtskultur des entsprechenden *E.coli*-Stammes angeimpft und bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,5$) bei 30°C und 220 rpm kultiviert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Die Kultur wurde 5 min bei 6000 rpm abzentrifugiert, das Bakterienpellet wurde in 20 ml eiskalter 50 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und 30 min inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation. Das Pellet wurde danach in 2,5 ml eiskalter 50 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und für mindestens 10 min inkubiert. Dieser Suspension wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15 % zugefügt. Zur Aufbewahrung wurden die kompetenten Bakterien aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

2.2.1.2 Transformation kompetenter Zellen

100 μl kompetenter Zellen wurden für die Transformation auf Eis aufgetaut, mit 0,1-1 μg Plasmid-DNA bzw. 7 μl Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Hitzeschockbehandlung bei 42°C für 2 min, die die Aufnahme der Fremd-DNA fördert. Zur Regeneration der Zellen wurden 800 μl antibiotikafreies Medium hinzugegeben und für 30 min bei 37°C unter stetigem Schütteln inkubiert. Durch Zentrifugation für 2 min bei 6000 rpm wurden die Bakterien geerntet und in 100 μl Medium resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-DNA wurde im analytischen Maßstab aus transformierten *E.coli*-Zellen mittels alkalischer Lyse aufgereinigt (Birnboim & Doly, 1979). Die Bakterien wurden zunächst mit EDTA und SDS unter Zugabe von NaOH aufgelöst. Im stark basischen pH-Bereich werden Proteine und hochmolekulare genomische DNA denaturiert, während Plasmide im ringförmigen oder „super-

coiled“ Zustand verbleiben. Durch schnelle Zugabe von Ammoniumacetat entsteht ein schwer löslicher Komplex aus genomischer DNA, der zusammen mit den denaturierten Proteinen und Zelltrümmern bei der Zentrifugation sedimentiert. Aus dem plasmidhaltigen Überstand wurde die gelöste Plasmid-DNA mit Isopropanol ausgefällt (siehe Kapitel 2.2.1.6), verbleibende Salze wurden durch Waschen mit 70 % Ethanol entfernt.

3 ml einer Übernachtskultur wurden für 2 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl Lösung I aufgenommen. 300 µl Lösung II wurden hinzupipettiert. SDS und NaOH lösen die Zellmembran auf und setzen den Zellinhalt frei. Um Zelltrümmer, Proteine, RNA und genomische DNA zu präzipitieren wurden 300 µl Lösung III zugegeben und vermischt. Es wurde 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zentrifugation wurde wiederholt. Die in der wässrigen Phase enthaltene Plasmid-DNA wurde mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol durch 15-minütige Zentrifugation präzipitiert. Im Anschluss wurde die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen.

Lösung I: 50 mM Tris/HCl, pH 8
 10 mM EDTA
 100 µg/ml RNase A

Lösung II: 200 mM NaOH
 1 % SDS

Lösung III: 3 M KaAc, pH 5,5

2.2.1.4 Plasmid-Midi- bzw. Maxi-Präparation

Die Plasmidpräparation erfolgte nach den Herstellerangaben mit dem Plasmidkit der QIAGEN GmbH. Dieser Kit basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Die anschließende Reinigung der niedermolekularen Plasmid-DNA erfolgt durch Ionenaustauschchromatographie

2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen wurde durch die Messung der Extinktion bei 260 und 280 nm bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht bei einer Schichtdicke einer Meßküvette von 1 cm einem Gehalt von 5 µg/ml DNA oder 35 µg/ml RNA. Da Proteine und Phenol UV-Licht bei 280 nm absorbieren, kann der Reinheitsgrad der Nukleinsäurepräparation durch Bildung des Verhältnisses

OD₂₆₀/OD₂₈₀ bestimmt werden. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, durch Verunreinigung sinkt er.

2.2.1.6 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrierung, Reinigung und zum Umpuffern wurden DNA-Lösungen mit dem 2,5-fachen Volumen und 0,1 Volumen 3 M NaAc pH 5,2 versetzt. Es wurde gevortext und 30 min bei RT inkubiert. Dabei kommt es zur Ausfällung der DNA, die im nachfolgenden Schritt bei RT durch 30-minütige Zentrifugation mit 13000 g präzipitiert wurde. Das Präzipitat wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE, bzw. Wasser resuspendiert.

2.2.1.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind natürlicherweise in Bakterien vorkommende DNAsen, die dem Abbau von Fremd-DNA dienen. Restriktionsendonukleasen binden spezifisch an zumeist palindromartig angeordnete DNA-Erkennungssequenzen und schneiden innerhalb dieser Erkennungssequenz die DNA durch Spaltung von zwei Phosphodiesterbindungen.

Für einen analytischen Restriktionsansatz wurden 0,5-2 µg DNA verwendet. Bei präparativen Anwendungen wurden 2-5 µg DNA eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 10-20 µl mit 0,1-1 U Enzym/µg DNA (1 Unit Spaltung von 1 µg DNA/h).

Verwendet wurden Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs mit den jeweils empfohlenen 10 x Puffern. Die Reaktion wurde entweder durch Zugabe von Probenpuffer oder durch Hitzeinaktivierung abgestoppt.

2.2.1.8 Ligation

Ligasen verknüpfen DNA-Fragmente kovalent über Phosphodiesterbindungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (Boehringer, Appligene, NEB) verwendet. Vektor-DNA (50-150 ng) und Insert-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 3:7 mit 1 µl Ligase in einem Reaktionsvolumen von 15 µl für 1 h bei RT inkubiert.

Die Ligation wurde in einem Endvolumen von 15 µl durchgeführt (Insert und 0,1-0,5 µg Vektor in einem Verhältnis von etwa 3:1, 1 µl 10 x Ligase-Puffer, 1 U T4 DNA-Ligase). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C oder 1 h bei RT. Der Ligationsansatz wurde im Anschluss direkt in *E.coli* transformiert.

2.2.1.9 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Für die Herstellung von kurzen DNA-Fragmenten aus Oligonukleotiden wurden die entsprechenden komplementären Oligonukleotide miteinander hybridisiert. Je 5 µl „sense“ und „reverse“ Oligonukleotide mit einer Konzentration von je 100 pmol/µl wurden in 100 µl H₂O gemischt, 2 min bei 95°C inkubiert und zur Hybridisierung langsam bei RT abgekühlt. In der Regel wurden die Oligonukleotide so synthetisiert, dass nach ihrer Hybridisierung an den Enden überstehende Einzelstrangsequenzen entstehen, die geschnittenen Restriktionsendonukleaseschnittstellen entsprechen. Die so hergestellten Oligonukleotide können direkt zur Ligation verwendet werden. Dieses Verfahren wurde für die Klonierung kurzer „tags“ in Expressionsvektoren angewandt.

2.2.1.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mittels PCR können definierte DNA-Sequenzen mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase amplifiziert werden. Die Amplifikation verläuft in drei Schritten: DNA-Hitze-Denaturierung, Primer-Anlagerung (Annealing) und DNA-Synthese (Extension). Die Primer sind chemisch synthetisierte Oligonukleotide (siehe Kapitel 2.1.3), die den zu amplifizierenden Bereich flankieren und zu jeweils einem der Stränge komplementär sind (sense- und reverse Primer). Die Verwendung von Primern, die am 5'-Ende zusätzlich zur Zielsequenz die Erkennungssequenz von verschiedenen Restriktionsenzymen tragen, ermöglicht eine gerichtete Klonierung der PCR-Produkte. Durch das exponentielle Ansteigen der DNA-Menge während der Reaktion erhält man nach 20-30 Zyklen aus einer geringen Menge Ausgangsmaterial eine sehr große Menge der gewünschten DNA-Sequenzen (Mullis & Faloona, 1987).

Für analytische Zwecke wurde die Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* eingesetzt. Ihr fehlt die 3'→5' Exonukleasefunktion („proof-reading“), so dass die amplifizierten Fragmente Mutationen in Form von Nukleotidaustauschen aufweisen können. Aus diesem Grund wurden PCR-Fragmente, die kloniert werden sollten, ausschließlich mit einer „proof-reading“ DNA-Polymerase, wie der Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* bzw. der Tli-Polymerase aus *Thermococcus litoralis*, amplifiziert. Sämtliche über PCR generierten Konstrukte wurden dennoch nach der Klonierung sequenziert, um Nukleotidaustausche auszuschließen.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes:

Plasmid-DNA:	min. 0,5 pg
Oligonukleotid 1:	25 pmol
Oligonukleotid 2:	25 pmol

10 x PCR-Puffer:	2,5 µl
MgCl ₂ :	0,5-2,5 mM
dNTPs (je 2,5 mM):	5 µl
Taq / Tli / Pfu:	0,5-1 µl
H ₂ O:	auf 25 µl

2.2.1.10.1 Fusions-PCR

Für die Klonierung der Metavinculin-cDNA kam ein Spezialfall der PCR zum Einsatz, die Fusions-PCR. Zu diesem Zweck wurde die cDNA der Metavinculin-Schwanzdomäne mit den in Tabelle angegebenen Oligonukleotiden 3 und 5 per PCR amplifiziert. Zusätzlich wurde unter Einsatz der Oligonukleotide 4 und 6 ein cDNA-Fragment der Vinculin-Kopfdomäne aus einem Vektor mit der Vinculin-cDNA amplifiziert, das mit dem neu hergestellten cDNA-Fragment der Metavinculin-Schwanzdomäne um einige Basenpaare überlappt. In der nun folgenden Fusions-PCR wurden die beiden überlappenden cDNA-Fragmente denaturiert und fungierten nach Absenken der Temperatur zugleich gegenseitig als „Primer“ und als „Template“. Anschließend wurde die entstandene Metavinculin-cDNA in einigen weiteren PCR-Zyklen amplifiziert. Für die weitere Klonierung wurde das PCR-Produkt in den Zwischenklonierungsvektor pCR-blunt (Invitrogen) ligiert.

2.2.1.11 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Zwischenklonierung wurden PCR-Fragmente entweder in den pGEM-T-Easy Vektor (Promega) oder in den pCR-blunt Vektor (Invitrogen) kloniert, da diese Systeme eine hohe Effizienz für rekombinante Klone garantieren. Die Ligation wurde in beiden Fällen nach Herstellerprotokoll durchgeführt und der Ligationsansatz direkt für die Transformation in *E.coli* verwendet.

2.2.1.12 Gerichtete Mutagenese

Der QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene macht es möglich, Nukleotide innerhalb einer Sequenz auszutauschen.

Zur Durchführung wird ein Vektor mit der zu mutierenden Zielsequenz benötigt, sowie zwei Oligonukleotid-Primer, die die einzubringende Mutation tragen. Die Primer binden an die komplementären Seiten des Vektors und werden von der PfuTurbo DNA Polymerase während einer PCR verlängert. Ist diese abgeschlossen, folgt ein Dpn1-Verdau. Die Dpn1-Endonuklease spaltet spezifisch methylierte DNA und kann so zwischen methylierter Ausgangs-DNA und neu

synthetisiertem PCR-Produkt unterscheiden. An den Verdau schloss sich eine Transformation in XL1-Blue kompetente Zellen an, aus denen der mutierte Vektor im Anschluss aufgereinigt werden konnte.

Mutagenese-Ansatz:

Plasmid-DNA:	50 ng
Oligonukleotid 1:	10 pmol
Oligonukleotid 2:	10 pmol
dNTPs (je 2,5 mM):	4 µl
Pfu-Puffer (10 x):	3 µl
Pfu-Polymerase:	1 µl
H ₂ O:	auf 30 µl

PCR-Zyklen:

Nach Abschluss der Zyklen und Zugabe von 1 µl Dpn1 folgte eine 1-stündige Inkubationszeit bei 37°C. Dann konnten die Ansätze direkt in kompetente Zellen transformiert werden.

2.2.1.13 DNA-Sequenzierung

Die von Sanger entwickelte Methode zur enzymatischen Sequenzierung doppelsträngiger DNA läuft ähnlich einer PCR ab (Sanger et al., 1977). Es wird dabei jedoch nur ein Primer verwendet. Zusätzlich zu den in einem gewöhnlichen PCR-Ansatz vorhandenen Desoxynukleotiden (dNTPs) werden bei einer Sequenzierung in geringer Menge Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingesetzt, welchen die 3'-OH-Gruppe fehlt. Durch den zufälligen Einbau der Didesoxynukleotide über die PCR kommt es zum Kettenabbruch der DNA-Synthese, denn das Fehlen des notwendigen 3'-OH-Endes verhindert die Ausbildung der nächsten Phosphodiesterbindung.

Die vier verwendeten Didesoxynukleotide sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass alle Fragmente, deren Synthese durch den Kettenabbruch gestoppt wird, an ihrem Ende in Abhängigkeit des jeweiligen Nukleotids einen dieser Farbstoffe tragen. Bei Anregung mit einem Laserstrahl weisen sie entsprechend unterschiedliche Emissionsspektren auf und können mit Hilfe des ABI Prism TM 310 Genetic Analyzers detektiert werden. Die Auswertung der Sequenzreaktion erfolgt automatisch über die zugehörige Software.

Zunächst wurde eine PCR mit einem Premix (PE Applied Biosystems) durchgeführt, in welchem Desoxynukleotide, fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide sowie Taq-DNA-Polymerase enthalten waren. Als Template diente möglichst saubere Plasmid-DNA.

Zusammensetzung der Sequenz-Reaktion:

Nach erfolgter PCR wurden 10 µl H₂O, 2 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5) und 55 µl 100 % Ethanol zur Entfernung überschüssiger Primer, Desoxynukleotide und Didesoxynukleotide zugefügt und zentrifugiert (13000 g, 30 min). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 12,5 µl Template Suppression Reagent (PE Applied Biosystems) gelöst. Nach 2-minütiger Denaturierung bei 90°C konnte die Probe zur Sequenzierung eingesetzt werden.

2.2.1.14 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und effektive Methode, DNA-Fragmente von 0,5 bis 25 kb Länge voneinander zu trennen und zu identifizieren. Dabei bewegen sich die negativ geladenen DNA-Moleküle in der Matrix des Gels mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist, zur Anode. Je nach Größe der zu analysierenden Nukleinsäurefragmente wurde die Agarosekonzentration des Gels so gewählt, dass eine optimale Auftrennung im gewünschten Bereich vorlag. Die entsprechende Agarosemenge wurde in 0,5 x TBE-Puffer durch Kochen gelöst, nach Abkühlen auf 60°C in eine Gelkammer gegossen. Pro Gel wurden 4 µl einer Ethidiumbromidlösung in die Kammer gegeben und mit der hinzugegebenen Agaroselösung durch Rühren möglichst gleichmäßig vermischt. Taschen zum Auftragen der Proben wurden durch einen eingesetzten Kamm geformt. Die DNA-Proben wurden mit 5 x Probenpuffer versetzt und in die Taschen geladen. Die Auftrennung erfolgte in 0,5 x TBE bei 1-10 V/cm.

Nach Interkalation in die DNA-Moleküle fluoresziert Ethidiumbromid unter UV-Licht. Nach der Auftrennung lassen sich die Größe sowie ungefähre DNA-Mengen durch Vergleich mit einem ebenfalls aufgetragenen Eichstandard bestimmen. Als Molekulargewichtsstandard wurde durch die Restriktionsenzyme EcoRI und Hind III gesplattene DNA des Lambda-Phagen verwendet.

0,5 x TBE: *45 mM Tris/Cl, pH 8*
 0,045 % Borsäure
 2 mM EDTA

2.2.1.15 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde nach der Gelelektrophorese unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und im Anschluss unter Zuhilfenahme des „Qiaquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinbestimmung

2.2.2.1.1 Proteinbestimmung mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten

Zur schnellen Proteinkonzentrationsbestimmung wurden die Extinktionen von Proteinlösungen bei 280 nm gemessen und der Proteingehalt durch den molaren Extinktionskoeffizienten ϵ bestimmt.

$$E = a \epsilon W + b \epsilon Y$$

a: Anzahl der Tryptophan-Reste

b: Anzahl der Tyrosin-Reste

$\epsilon W = 5690$ und $\epsilon Y = 1280$

2.2.2.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinkonzentrationsbestimmungen nach Bradford wurden mit dem Farbstoff Coomassie Brilliantblau G250 bestimmt (Bradford, 1976). Dieser Farbstoff reagiert mit Proteinen, wahrscheinlich mit Argininresten und bildet Komplexe, die ein Absorptionsmaximum bei 595 nm aufweisen, während ungebundener Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 465 nm zeigt. Da die Absorptionsänderung über einen großen Bereich linear von der Proteinkonzentration abhängt, ist es möglich, die Konzentration von Proteinlösungen zu ermitteln.

20 μ l Proteinlösung wurde in einer 96-Loch-Platte mit 100 μ l Bradford-Reagenz versetzt und nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln bei 595 nm photometrisch mittels eines ELISA-Readers gemessen. Anhand einer Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA-Konzentration zwischen 10-100 μ g Protein/ml) wurde die Proteinkonzentration der Proben ermittelt.

2.2.2.1.3 Densitometrische Proteinbestimmung

Da es für die vergleichende Charakterisierung Vinculins und Metavinculins unerlässlich ist, dass gleiche Proteinmengen miteinander verglichen werden, wurde die Konzentration beider Proteine zusätzlich densitometrisch ausgewertet. Dazu wurden definierte Mengen der Proteine zusammen mit definierten Mengen Aktin auf ein SDS-Gel geladen. Das Coomassie-gefärbte Gel wurde densitometrisch ausgewertet und die Konzentrationen der Proteine konnten aus den Absorptionswerten

und ihrem Molekulargewicht berechnet werden. Zusätzlich ermöglicht die Methode einen direkten Vergleich bezüglich der Qualität aller zu bestimmenden Proteine.

2.2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine können durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen proportional zu ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Nettoladung der Proteine wird dabei durch das negativ geladene SDS kompensiert. Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Lämmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Die Gele bestanden aus einem Trenngel, das mit einem niedrigprozentigen Sammelgel überschichtet wurde. Die Prozentigkeit der Trenngele richtete sich nach dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine und lag im Bereich von 7-15 %.

2.2.2.2.1 Herstellung der Gele

Die mit Ethanol gesäuberten Glasplatten wurden zusammengebaut, das Trenngel wurde in den durch die „spacer“ geschaffenen Spalt gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisieren des Acrylamids wurde das Isopropanol dekantiert, das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesetzt.

Zusammensetzung des Trenngels:

	7,0 %	10,0 %	12,5 %	15 %
Acrylamid	7	10	12,5	15
Trenngelpuffer	7,5	7,5	7,5	7,5
H ₂ O	15,2	12,4	9,9	7,4
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01
APS	0,2	0,2	0,2	0,2

Zusammensetzung des Sammelgels:

Substanz	Volumen (ml)
Acrylamid	1,3
Sammelgelpuffer	2,5
H ₂ O	6,2
TEMED	0,01
APS	0,2

<i>Acrylamidlösung:</i>	<i>30 % Acrylamid</i> <i>0,8 % Bisacrylamid</i>
<i>Trenngelpuffer:</i>	<i>1,5 M Tris/Cl, pH 8,8</i> <i>0,4 % SDS</i>
<i>Sammelgelpuffer:</i>	<i>0,5 M Tris/Cl, pH 6,8</i> <i>0,4 % SDS</i>
<i>APS:</i>	<i>10 % Ammoniumpersulfatlösung</i>

2.2.2.2.2 Elektrophorese

Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit 5-fach Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und in die Taschen geladen. Das Gel lief zunächst bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA (Sammelgel), dann bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA (Trenngel). Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden zur weiteren Analyse mittels Semi-Dry-Blot (Kapitel 2.2.2.3) auf eine Membran transferiert oder im Gel direkt mit einer Coomassie-Färbelösung nachgewiesen. Dazu wurde das SDS-Gel 30-60 min in Coomassie-Färbelösung schwenkend bei RT inkubiert. Anschließend wurde mittels Entfärber-Lösung überschüssiger Farbstoff entfernt, bis die Banden deutlich kontrastiert erkennbar waren.

Als Größenstandards dienten „low molecular weight marker“ (LMW) und „high molecular weight marker“ (HMW) von Sigma.

<i>5-fach-Probenpuffer:</i>	<i>375 mM Tris/Cl, pH 6,8</i> <i>2 % SDS</i> <i>12 % Glycerol</i> <i>0,05 % Bromphenolblau</i> <i>10 % β-Mercaptoethanol</i>
<i>Coomassielösung:</i>	<i>10 % Eisessig</i> <i>25 % Isopropanol</i> <i>0,025 % Coomassie Blau</i>

Entfärbelösung: 10 % Eisessig
 12,5 % Isopropanol

2.2.2.3 „Semidry“ Western-Blot

Zum Transfer der in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf die Nitrocellulose-Trägermembran wurde ein semi-dry-Verfahren angewendet. Die Gele wurden nach dem Lauf kurz in Blotpuffer äquilibriert und der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut: Negativ gepolte Graphitplatte, 3 Blatt Whatmanpapier (in Blotpuffer getränkt), Polyacrylamidgel, Nitrocellulosemembran (in Blotpuffer äquilibriert), 3 Blatt Whatmanpapier (in Blotpuffer getränkt), positiv gepolte Graphitplatte. Geblottet wurde bei einer Stromstärke von 2-3 mA/cm² (etwa 100 mA pro Minigel) für 1 – 1,5 h. Anschließend wurde zur Kontrolle des Protein-Transfers und zur Kennzeichnung der Markerbanden eine durch Wasser reversible Ponceau-Rotfärbung durchgeführt.

Blotpuffer: 150 mM Glycin
 25 mM Tris/HCl, pH 8,5
 10 % Methanol

2.2.2.3.1 Nachweis von immobilisierten Proteinen mit Antikörpern

Zum Nachweis von immobilisierten Proteinen auf Nitrocellulose-Trägermembranen wurden Primärantikörper eingesetzt, die mit Hilfe von Enzym-gekoppelten, polyklonalen Sekundärantikörpern dargestellt werden konnten. Hierdurch erreicht man eine Signalverstärkung, da polyklonale Antikörper mehrere Epitope eines Primärantikörpers besetzen und selbst geringste Proteinmengen können nachgewiesen werden.

Die Nitrocellulose-Membran wurde zunächst für 1 h bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver in TBST zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Das Milchpulver wurde durch kurzes Waschen mit 1x TBST-Puffer entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem in TBST + 2 % BSA entsprechend verdünnten Erstantikörper für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nicht gebundene Primärantikörper wurden durch mehrmaliges Waschen mit TBST entfernt, bevor der gegen den Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper (verdünnt in TBST + 2 % BSA) für 30-60 min bei RT zugegeben wurde.

Der Blot wurde mehrmals mit TBST und einmal für mindestens 15 min mit TBSX gewaschen. Detergenzien wurden durch kurzes Spülen mit PBS entfernt.

HRP-Entwicklung

Der Nachweis der mit Peroxidase (HRP = horseradish-peroxidase) gekoppelten Zweitantikörper erfolgte meist mit dem „Enhanced Chemiluminescence System“ (ECL, Amersham). Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol und löst dabei Chemilumineszenz aus. Das dabei entstehende Licht färbt den auf den Blot aufgelegten Röntgenfilm. Zur ECL-Entwicklung wurden ECL-Lösung I und ECL-Lösung II nach Herstellerangaben in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und der Blot darin für 1 min inkubiert. Überschüssiges ECL-Reagenz wurde auf einem Whatmanpapier abgestreift, der Blot wurde mit Frischhaltefolie abgedeckt und auf einen ECL-Film aufgelegt.

AP-Entwicklung

Alternativ können auf Nitrocellulosemembranen immobilisierte Proteine über die Entwicklung mittels eines mit alkalischer Phosphatase-markierten (AP) Zweitantikörpers nachgewiesen werden. Bei der Entwicklung mit alkalischer Phosphatase besteht die Möglichkeit, auf Nitrocellulosemembranen immobilisierte Proteine direkt über eine Farbreaktion nachzuweisen. Dieses Verfahren ist weniger sensitiv als die Entwicklung mit ECL, wurde aber eingesetzt, wenn genug Proteinmaterial auf den zu entwickelnden Blots vorhanden war oder für die Gegenfärbung einer Blotmembran nach vorheriger ECL-Entwicklung mit einem anderen Antikörper. Hierzu wurden 60 µl NBT-Stammlösung (50 mg/ml in DMF) und 30 µl BCIP-Stammlösung (50 mg/ml in DMF) in 10 ml AP-Puffer auf die Membran gegeben. Die Membran wurde bis zur Entwicklung der Farbreaktion im Dunkeln inkubiert, die Farbreaktion wurde durch Waschen mit H₂O abgestoppt. Dieses Verfahren wurde auch für die Epitopkartierung monoklonaler Antikörper auf PepScan-Membranen (siehe Kapitel 2.2.2.4) eingesetzt, da die ECL-Lösungen für HRP (siehe oben) H₂O₂ enthalten, das bei mehrmaligem Gebrauch der Membranen die darauf immobilisierten Peptide, bzw. Proteine so stark schädigt, dass diese mit den entsprechenden Antikörpern nicht mehr nachweisbar sind.

*1 x TBST: 20 mM Tris / HCl, pH 8,8
 140 mM NaCl
 0,1 % Tween-20*

*1 x TBSX : 20 mM Tris / HCl, pH 8,8
 140 mM NaCl
 1 % Triton-X-100*

AP-Puffer : 100 mM Tris/Cl, pH 9,5
 100 mM NaCl
 5 mM MgCl₂

2.2.2.4 Epitopkartierung monoklonaler Antikörper mit PepScan-Membranen

Zur Epitopkartierung monoklonaler α -Metavinculin-Antikörper wurden sogenannte PepScan-Membranen verwendet. Dies sind Membranen, auf denen die gesamte Aminosäuresequenz des Metavinculin-Einschubs in Form kurzer, aber überlappender Peptide direkt synthetisiert wurde (AG Ronald Frank, GBF Braunschweig). Die Inkubation mit α -Metavinculin-Antikörpern und anschließende AP-Entwicklung (siehe Kapitel 2.2.2.3.1) führt im Normalfall zur Entwicklung einiger weniger „Spots“ der Membran, was eine Eingrenzung des Epitops des eingesetzten Antikörpers auf wenige Aminosäuren erlaubt.

Die Membranen wurden zur besseren Benetzbarkeit mit einigen Tropfen EtOH angefeuchtet, 3 x mit TBS gewaschen und bei RT in Absättigungslösung (10 % FCS in TBS) über Nacht inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit T-TBS erfolgte die Inkubation mit dem zu charakterisierenden Antikörper (min. 3,5 h RT). Nach der Inkubation wurde die Membran erneut 3 x mit T-TBS gewaschen und mit einem 1:500 in Absättigungslösung verdünnten α -Maus-AP-Antikörper für min. 1,5 h inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss jeweils 2 x mit T-TBS und CBS gewaschen, in eine Glaswanne gelegt und mit 10 ml der Färbelösung überschichtet. Nach Entwicklung der Farbreaktion wurde die Membran 2 x mit PBS gewaschen. Zur Entfernung eines fertig charakterisierten Antikörpers wurde die Membran zunächst zweimal mit H₂O gewaschen. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit DMF und Ultraschallbehandlung in einem Ultraschallbad bis zur vollständigen Entfärbung der Membran. Nach erneutem Waschen mit DMF sowie dreimaligen Waschen mit H₂O wurde die Membran jeweils 3 x mit Puffer A, Puffer B und Ethanol gewaschen. Für jeden Waschschriff wurde die Membran für 5 min im Ultraschallbad bei 40°C inkubiert. Nach dieser Behandlung können die PepScan-Membranen für die Charakterisierung eines weiteren Antikörpers eingesetzt werden.

TBS (1 l) : 8 g NaCl
 0,2 g KCl
 6,1 g Tris/Cl, pH 7

T-TBS: *TBS + 0,05 % Tween 20*

<i>CBS (1 l):</i>	<i>8 g NaCl</i> <i>0,2 g KCl</i> <i>2,1 g Citronensäure-1-hydrat</i> <i>pH 7</i>
<i>Puffer A:</i>	<i>8 M Harnstoff</i> <i>1 % SDS</i> <i>0,5 % β-Mercaptoethanol</i> <i>pH 7</i>
<i>Puffer B:</i>	<i>10 % Essigsäure</i> <i>50 % Ethanol</i> <i>40 % H₂O</i>
<i>Färbelösung:</i>	<i>zu 10 ml CBS</i> <i>50 μl 1 M MgCl₂</i> <i>40 μl BCIP (Stammlösung : 6 mg BCIP in 100 μl DMF)</i> <i>60 μl MTT (Stammlösung: 5 mg MTT in 100 μl 70 % DMF)</i>

2.2.2.5 ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“)

Der ELISA wurde als „solid phase binding assay“ eingesetzt, um *in vitro* die Interaktion zweier Proteine zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode auch zum Test monoklonaler Antikörper eingesetzt. Nach der Adsorption eines Proteins an der Oberfläche einer Mikrotiter-Platte erfolgte entweder die Inkubation mit einem zu testenden Antikörper oder die Inkubation mit einem zweiten Protein, das wiederum durch den Einsatz spezifischer Antikörper nachgewiesen wurde.

In der Regel wurden 25 pmol Protein in Kopplungspuffer an ein well einer 96-well-Mikrotiter-Platte (Greiner Microton / Nunc Polysorb) adsorbiert (4°C, üN). Alternativ kann die Kopplungsreaktion auch unter Pufferbedingungen stattfinden, die eher physiologischen Bedingungen entsprechen. Nicht gebundenes Protein wurde durch mehrmaliges Waschen der Platte mit ELISA-Puffer entfernt. Die Absättigung freier Bindungsstellen erfolgte mit 1 % BSA in ELISA-Puffer (200 μ l, 2h, RT). Nach erneutem mehrmaligen Waschen folgte die Inkubation mit dem zu untersuchenden Antikörper (1h, RT), bzw. zweiten Protein (2h, RT). Der ELISA wurde durch Verwendung eines HRP-gekoppelten Zweitantikörpers durch eine Farbreaktion entwickelt. Als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase diente dafür ABTS (2,2-Azinobis(3-Ethylbenzthiazolin-Sulfonsäure), Sigma) in ELISA-

Entwicklungspuffer. Die Farbentwicklung wurde mit einem ELISA-Reader (Dynatech, Denkendorf) dokumentiert.

Kopplungspuffer: 50 mM NaHCO₃, pH 9,6

ELISA-Puffer: 0,05 % Tween 20 in CMF-PBS

Citratpuffer
0,1 M Citronensäure
0,1 M Tri-Na-Citrat

ELISA-Entwicklungslösung
10 ml Citratpuffer
10 µl 30 % H₂O₂
100 µl ABTS (40 mM in H₂O)

2.2.2.6 CD-Spektroskopie

Zur Untersuchung von Proteinen auf ihre Sekundärstruktur wurde die CD-Spektroskopie eingesetzt. Dazu wurden die zu untersuchenden Proteine in CD-Spektroskopiepuffer auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl verdünnt, in eine 0,2 cm breite Quartzglasküvette pipettiert und unter Verwendung des Puffers als Referenz im CD-Spektroskop (Jasco Systems) vermessen. Die CD-Spektren wurden mit Hilfe der zugehörigen Software (DiCroProt, Jasco Systems) ausgewertet.

CD-Spektroskopiepuffer: 20 mM NaP, pH 7,2
80 µM EGTA

2.2.2.7 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine wurden die Genkonstrukte in den Expressionsvektor pQE30 (Qiagen) kloniert. Dieser Vektor ermöglicht es, das gewünschte Polypeptid mit einem Fusionsanteil von 6 N-terminalen Histidinen in *E.coli* zu exprimieren. Der His-tag bindet stark an Nickel-NTA-Agarose, wodurch sich eine einfache Aufreinigungsmethode ergibt. Zudem sind die Fusionsproteine N-terminal mit einem FLAG-tag versehen, welcher eine einfache Detektion der Proteine mittels α-FLAG-Antikörper im Western-Blot ermöglicht.

Die Expression erfolgte im *E.coli* Stamm M15 bzw. BL21. Beide Stämme tragen das pRep4-Plasmid, welches für den lac-Repressor kodiert und zudem eine Kanamycinresistenz aufweist. Über dieses

Plasmid lässt sich die Expression mit Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) kontrollieren, da es an den lac-Repressor bindet und ihn so inaktiviert.

2.2.2.7.1 Expression von rekombinanten Proteinen

Zur quantitativen Aufreinigung von Proteinen wurden die pQE30-Konstrukte in M15 transformiert (siehe Kapitel 2.2.1.2). Es wurden 1-2 l Hauptkulturen (2 x YT-Medium mit Kana/Amp, 30 µg/µl L-Prolin, 5 µg/µl Thiamin, 0,2 % Glycerin) angeimpft, die bei 37°C unter ständigem Schütteln (220 rpm) inkubiert wurden. Bei OD = 0,7-1,0 erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG die Induktion und eine weitere Inkubation bis zur spätlogarithmischen Wachstumsphase. Die Bakterien wurden im Anschluss durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt (6500 rpm) bei 4°C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 20-40 ml Lysispuffer mit 1 mg/ml Lysozym sowie Proteaseinhibitoren und β-Mercaptoethanol resuspendiert und bei -80°C nach Zugabe von Chelate-P eingefroren.

<i>2 x YT-Medium:</i>	<i>16 g/L Trypton</i>
	<i>10 g/L Yeast-Extract</i>
	<i>5 g/L NaCl</i>
<i>Proteaseinhibitoren:</i>	<i>AEBSF, 0,2 M in H₂O (1:500)</i>
	<i>PepstatinA, 1 mM in Ethanol (1:500)</i>
	<i>Leupeptin, 10 mM in H₂O (1:500)</i>
	<i>Trasylol, 2,8 mg/ml in H₂O (1:500)</i>

2.2.2.7.2 Zellaufschluß und Proteinaufreinigung über Ni-NTA-Agarose-Beads

Die rekombinanten Proteine wurden mit Hilfe einer Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die rekombinanten Proteine binden hierbei über ihren N-terminalen Fusionsanteil bestehend aus 6 Histidinen an Nickel-Nitriloessigsäure (Nickel-NTA), welche wiederum an eine Matrix aus Agarose gebunden ist.

Um die rekombinanten Proteine unter nativen Bedingungen aufzureinigen, wurde das Bakterienlysate zunächst bei 37°C aufgetaut und sofort mit frischen Proteaseinhibitoren und β-Mercaptoethanol versetzt. Alle folgenden Schritte fanden auf Eis, bzw. bei 4°C statt. Die Zellen wurden per Ultraschall aufgeschlossen (4 x 30 s Intervalle bei 80 W) und anschließend 30 min bei 30000 g abzentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt befanden sich die löslichen Proteine im Überstand, der auf die zuvor durch zweimaliges Waschen mit Lysispuffer äquilibrierte Ni-NTA-Agarose gegeben wurde. Es

folgte eine einstündige Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Schwenken, welches die Bindung der Proteine an die Matrix erhöhen sollte. Um die Reinheit der Proteinproben zu erhöhen wurde zweimal mit Lysispuffer, zweimal mit Waschpuffer und zweimal mit Elutionspuffer ohne Histidin gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte durch Zugabe von Histidin im Überschuss zum Elutionspuffer. Nach jeweils einer kurzen Inkubationszeit (5-10 min) wurden 3 Elutionsfraktionen von je 2,5 ml gesammelt. Diese wurden mit einer Ponceau-Rotfärbung auf einer Nitrocellulosemembran voruntersucht. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und mittels einer PD10-Säule in den gewünschten Puffer umgepuffert. Um die Aufreinigung der Proteine zu verfolgen, wurden Aliquots der einzelnen Aufreinigungsschritte genommen und im SDS-Gel aufgetragen.

Lysispuffer: 50 mM NaP, pH 8
 300 mM NaCl
 25 mM Imidazol
 0,5 % Tween 20
 frisch: Proteaseinhibitoren, β -Mercaptoethanol, 1 mg/ml Lysozym

Waschpuffer: 50 mM NaP
 300 mM NaCl
 0,5 % Tween 20
 8,7 % Glycerin
 frisch: Proteaseinhibitoren, β -Mercaptoethanol

Elutionspuffer: 50 mM NaP, pH 6,7
 100 mM KCl
 0,5 mM EGTA
 25 mM EDTA
 0,1 % Triton-X-100
 (150 mM Histidin)
 frisch: Proteaseinhibitoren, β -Mercaptoethanol

Proteaseinhibitoren: siehe Kapitel 2.2.2.7.1

2.2.2.8 Umpuffern von Proteinen

Um die aufgereinigten Proteine in die für die folgende Experimente erforderlichen Puffersysteme zu überführen, wurden die im folgenden dargestellten Methoden eingesetzt.

2.2.2.8.1 Umpuffern von Proteinen über Gelfiltration: PD10-Säulen

Über eine PD10-Säule (Pharmacia) lassen sich Volumina von bis zu 2,5 ml umpuffern. Dazu wurde die Säule zunächst mit 25 ml des Zielpuffers äquilibriert. Im Anschluss konnte ein Gesamtvolumen von 2,5 ml Probe aufgetragen werden. Was das Probenvolumen geringer, wurde mit Zielpuffer auf ein Volumen von 2,5 ml aufgefüllt. Die Elution erfolgte durch die Zugabe von 3,5 ml Zielpuffer.

2.2.2.8.2 Umpuffern kleinerer Volumina über Nitrocellulosemembranen

Kleinere Volumina wurden über kleine runde Nitrocellulosemembranen (Millipore) umpuffert. Dazu wurden diese vorsichtig auf die Oberfläche des auf 4°C vorgekühlten Zielpuffers (500-1000 ml) gesetzt. Auf jede Membran wurden bis zu 30 µl der umzupuffernden Proteinlösung pipettiert. Nach 1-stündiger Inkubation bei 4°C wurde die Proteinlösung vorsichtig von den schwimmenden Membranen abgezogen und die Konzentration bestimmt.

2.2.2.9 Ankonzentrieren von Proteinen

Um die Konzentration von Proteinen in Lösung zu erhöhen, wurde die relativ schnelle und einfache Methode der Zentrifugation der Proteinlösung in Röhrchen mit integriertem Filter (Millipore) angewendet. Die für die Ankonzentration der (Meta-)Vinculin-Schwanzdomänen verwendete Ausschlussgrenze der Filter betrug 10 kDa. Bei Zentrifugation mit 5000 g kommt es zur Ansammlung des Konzentrats oberhalb des Filters. Eine 10 ml Ausgangslösung wurde je nach Protein und gewünschter Endkonzentration auf 1-5 ml ankonzentriert.

2.2.2.10 Kosedimentation mit F-Aktin

In Kosedimentationsstudien wird das Bindungsverhalten von Proteinen an F-Aktin untersucht. Das für die Sedimentation eingesetzte G-Aktin wurde freundlicherweise von Dr. Kathrin Schlüter zur Verfügung gestellt. Das bei -80°C gelagerte Aktin wurde schnell aufgetaut und dann auf Eis gestellt. Zur Aktinpolymerisation wurden 20 µM Aktin in F-Aktinpuffer 1 h bei 37°C inkubiert. Man

2.2.2.10.1 „High speed“-Kosedimentation

Die Versuchsansätze wurden mit konstanter Menge F-Aktin (3 μM) und steigender Menge an Fusionsprotein (0,6 – 3 μM) in „Beckman Polyallomer Centrifuge Tubes“ pipettiert und mit Polymerisationspuffer auf ein Gesamtvolumen von 75 μl aufgefüllt. Daraufhin wurden die Ansätze 1 h bei 37°C inkubiert, bevor sie 1 h bei 100000 g in einer Ultrazentrifuge (Airfuge, Beckman) zentrifugiert wurden. Nach der Zentrifugation erfolgte eine vorsichtige Trennung von Überstand und Pellet. Die Pellets wurden mit 100-150 μl Polymerisationspuffer gewaschen und anschließend mit 30 μl SDS-Probenpuffer versehen. Nachdem die Überstände einer TCA-Fällung unterzogen worden waren, wurden sie ebenfalls mit 30 μl SDS-Probenpuffer versetzt. Die so erhaltenen Proben konnten in einer SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert werden.

F-Aktinpuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,4
25 mM KCl
2 mM MgCl₂
frisch: 1 mM ATP, 0,2 mM DTT

2.2.2.11 Bündelungsassays mit TRITC-markiertem Phalloidin

Mit Hilfe des Bündelungsassays kann der Einfluss einzelner Fusionsproteine auf die F-Aktinstruktur fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

G-Aktin (3 μM) und Fusionsproteine wurden in diversen molaren Verhältnissen vermischt und mit F-Aktinpuffer auf ein Endvolumen von 50 μl aufgefüllt. Nachdem die Ansätze gut durchmischt waren, wurden sie 2 h bei 37°C inkubiert. TRITC-markierte Phalloidin-Stammlösung (0,1 mg/ml in Methanol) wurde im Verhältnis 1:10 zugegeben und erneut 1 h bei 37°C inkubiert. Hiernach konnten die Ansätze kurzfristig bei 4°C gelagert werden oder

Sie wurden direkt analysiert. Zum Mikroskopieren wurde ein kleiner Tropfen (ca. 1,5 μl) auf einen Objektträger gegeben. Ein rundes Deckgläschen wurde aufgelegt und die Proben konnten direkt in Lösung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet werden.

2.2.2.12 Proteinfällung

2.2.2.12.1 TCA-Fällung

Proteine können durch Säure-denaturierende Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt werden. Dazu wurde die Proteinlösung mit TCA zu einer Endkonzentration von 15 % versetzt und 1 h auf Eis bzw. bei 4°C über Nacht inkubiert. Die gefällten Proteine wurden 15 min bei 13000 x g sedimentiert und getrocknet. Das getrocknete Sediment wurde in SDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 2.2.2.2.2) resuspendiert.

2.2.2.12.2 Methanol/Chloroform-Fällung

Proteine lassen sich aus wässrigen Lösungen mit Hilfe der Methanol-Chloroform-Fällung ausfällen. Dazu wurden die Proteine in Methanol verdünnt und durch Zugabe von Chloroform ausgefällt. Bei Zugabe von Wasser entstehen nach Zentrifugation (10000 x g, 5 min) zwei Phasen, an deren Grenze sich das ausgefällte Protein sammelt. Die wässrige Phase wurde vorsichtig dekantiert. Nach erneuter Zugabe von Methanol und einem Zentrifugationsschritt (10000 x g, 5 min) befindet sich das ausgefällte Protein im Pellet.

2.2.2.13 Chemische Vernetzung („chemical crosslink“)

Der „chemical crosslink“ ist eine Methode, mit deren Hilfe enge Assoziationen von Proteinen durch Zugabe eines „crosslinkers“ stabilisiert werden können. Die stabilisierten Proteinkomplexe können anschließend per SDS-PAGE und Western-Blot untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode verwendet, um die Ausbildung von VT- bzw. MVT-Oligomeren bei Inkubation mit sauren Phospholipiden bzw. F-Aktin zu charakterisieren.

Hierzu wurden 100 pmol Protein vorgelegt, mit steigenden Mengen PIP₂ bzw. F-Aktin versetzt (Gesamtvolumen 30 µl) und 15-30 min bei 37°C vorinkubiert. In „crosslinks“ mit PIP₂ wurde dazu der Standard-Phosphatpuffer verwendet, in „crosslinks“ mit F-Aktin wurde ein Phosphatpuffer verwendet, der mehr Salze und ATP enthielt, um die Polymerisation von Aktin zu ermöglichen. Befand sich PIP₂ im Ansatz, wurden die Proben mit 7,5 µl „crosslinker“-Master-Mix (100 µl Sulfo-NHS mit 22 mg/ml und 25 µl EDC mit 19 mg/ml) versetzt und 15-30 min bei 30°C inkubiert. In „crosslinks“ mit F-Aktin wurde der „crosslinker“ DSS in einer Endkonzentration von 30 µM zugesetzt. Die Reaktion wurde in beiden Fällen durch Zugabe von 12,5 µl SDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 2.2.2.2.2) beendet. Die Analyse der Proben erfolgte im Western-Blot.

Standard-Phosphatpuffer: 50 mM NaP, pH 7,2
 0,2 mM EGTA
 frisch: β-Mercaptoethanol (1:1000), Proteaseinhibitoren (1:500)

F-Aktin-“Crosslink“-puffer: 50 mM KP, pH 7,6
 0,2 mM CaCl₂
 0,2 mM ATP
 100 mM NaCl
 2 mM MgCl₂

2.2.2.14 Saccharose-Lipidvesikel-Pulldown

Um die Bindung von Proteinen an Lipide zu untersuchen, wurden Saccharose-Lipidvesikel-Pulldownassays durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 50-500 pmol Protein (40 µl) mit Saccharose-gefüllten Lipidvesikeln (40 µl, 16 µg) in Saccharose-Lipidvesikel-Pulldownpuffer I bei 37°C in einem Schüttler inkubiert, anschließend wurden die Proben bei 20000 g für 15 min abzentrifugiert. Überstand und Pellet wurden getrennt und das Pellet wurde in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Der Überstand wurde einer Methanol/Chloroform-Fällung unterzogen. Nach der Zentrifugation wurde das

Die zu untersuchenden Gewebe wurden den Tieren entnommen und in PBS von Bindegewebe, Blut und Fett befreit. Anschließend wurden die gesäuberten Gewebe schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Gewebe wurden mit vorgekühlten Mörsern rasch so fein wie möglich zermörsert. Je 1 g Gewebe wurde in 2 ml RIPA-Puffer aufgenommen. Die Gewebeproben wurden 15 min aufgekocht und für 10 min bei 13000 g abzentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, mit jeweils ¼ Volumeneinheiten SDS-Probenpuffer versetzt und auf SDS-Gele aufgetragen.

RIPA-Puffer: *50 mM Tris/Cl, pH 7,5*
 150 mM NaCl
 1 % Triton-X-100
 0,25 % Desoxycholat
 1-2 mM EGTA

2.2.2.16 Das „Yeast Two-Hybrid“ System

Das „Yeast Two-Hybrid“ System ist eine relativ einfache Methode, *in vivo* bekannte Protein-Protein-Interaktionen näher zu charakterisieren, bzw. neue Liganden eines Proteins in einer Genbank zu identifizieren („screening“). Das Prinzip des Assays basiert auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren aus zwei voneinander trennbaren Domänen bestehen: einer DNA-bindenden- und einer transkriptionsaktivierenden Domäne. Werden beide Domänen in einer Zelle getrennt exprimiert, erfolgt keine Genaktivierung, da sie nicht direkt miteinander interagieren. Gelangen beide Domänen in der Zelle wieder in enge räumliche Nähe, wird die Funktionalität des Transkriptionsfaktors rekonstituiert. Dies kann über die Expression bestimmter Reportergene nachgewiesen werden.

Bei dem eingesetzten „Matchmaker Two-Hybrid System 3“ (Clontech) werden durch den Einsatz der Vektoren pGAD-T7 (Aktivierungsdomäne) und pGBK-T7 (DNA-Bindungsdomäne) die beiden Domänen des Transkriptionsfaktors GAL4 als Fusionsproteine mit den zu untersuchenden Proteinen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Treten Interaktionen zwischen beiden Proteinen auf, wird der Transkriptionsfaktor GAL4 rekonstituiert und somit eine Expression von Reportergenen ermöglicht. Als Reportergene dienen einerseits Wachstumsmarker, die es den Hefen bei Interaktion beider Proteine ermöglichen, auf den entsprechend aminosäurefreien Nährmedien zu wachsen. Andererseits wurden Interaktionen über die Aktivierung des Reportergens β -Galactosidase nachgewiesen. Hefekolonien mit Y2H-Protein-Protein-Interaktionen zeigen im β -Galactosidase-Filterassay unter Einsatz von X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galactosid) eine blaue Färbung. Die Durchführung der Versuche (Transformation, Selektion, Medienzusammensetzung, β -Galactosidase-Assays) erfolgte analog den Angaben des „Matchmaker Two-Hybrid System“-Protokolls (Clontech, Heidelberg).

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf 10 cm Schalen in DMEM-Medium (siehe Kapitel 2.1.7.3) mit entsprechenden Zusätzen bei 37°C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator. Zur Passage wurden die adhärennten Zellen nach Waschen mit warmem 1 x PBS mit einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert, bis ein Großteil der Zellen vom Gefäßboden abgelöst war. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an FCS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen 1:5 bis 1:20 in serumhaltigen Medium verdünnt und erneut ausgesät.

Zur Kultivierung auf Deckgläschen mussten diese zuvor gelatinisiert werden. Dazu wurden sterile eckige Deckgläschen (22x22 mm) in 6-Loch-Schalen, bzw. runde Deckgläschen (Ø 12 mm) in 24-Loch-Schalen platziert und 2 mit Gelatine (2 % in PBS) überschichtet. Die Gelatine wurde abgesaugt und die Deckgläschen unter UV-Licht getrocknet, bis sie einen milchigen Schleier aufwiesen. Anschließend konnten die Zellen ausgesät werden.

2.2.3.2 Transfektion von Zellen

Die transiente Transfektion von Zellen erfolgte mittels Kalziumphosphatpräzipitation. Die Methode basiert darauf, dass Fremd-DNA, die an Kalziumphosphatkristalle angelagert ist, unter geeigneten Pufferbedingungen von tierischen Zellen phagozytiert wird. Transfizierte Gene, die in Form von Vektor-DNA in den Kern gelangen, können dort transkribiert und somit exprimiert werden. Auf diese Weise wurde die Lokalisation von Proteinen, bzw. Proteinfragmenten in der Zelle untersucht.

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in entsprechenden Kulturgefäßen ausgesät. Sollten die Zellen später durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden, wurden sie auf Deckgläschen kultiviert. Vier Stunden vor Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Für die Transfektion wurden 1/10 Volumen des Kulturmediums als Transfektionslösung mit 1 µg DNA/ml Kulturmedium versetzt. Für die Transfektion einer 35 mm Schale (2 ml Kulturmedium) wurden somit 2 µg DNA in 200 µl Transfektionslösung verwendet. Dazu wurden 2 µg der gewünschten Plasmid-DNA mit sterilem MQ-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 90 µl eingestellt, tropfenweise mit 10 µl 20 x CaCl₂ versetzt und gevortext. Die DNA/CaCl₂-Lösung wurde langsam unter ständigem Vortexen in ein 15 ml Röhrchen mit 100 µl 2 x HEBS eingetropft, wobei die DNA zusammen mit dem Kalziumphosphat ausfällt und einen milchigweißen Niederschlag bildet. Das vollständige Ausfällen benötigte 30-60 min bei RT. Anschließend wurden die Präzipitate auf die zu transfizierenden Zellen gegeben und 16 h später durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Nach weiteren 24-48 h konnte die Expression des transfizierten Gens untersucht werden.

2.2.3.3 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Für Immunfluoreszenzstudien mussten die Zellen vor der Antikörperinkubation fixiert und permeabilisiert werden. Nach Kultivierung der Zellen auf Deckgläschen wurde das Medium durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Fixierung erfolgte bei RT durch 20-minütige Inkubation mit 3,7 % Formaldehyd in PBS. Anschließend wurde die Fixierlösung durch erneutes dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen mit 0,2 % Triton-X-100 in PBS 15 min permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS konnte mit der Inkubation der Antikörper begonnen werden.

2.2.3.4 Immunfluoreszenz

Mit dieser Methode lassen sich strukturgebundene Proteine in Zellpräparaten spezifisch und mit hoher Auflösung darstellen.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Aktin-Cytoskeletts und assoziierter Strukturen wurden fixierte permeabilisierte Zellen mit 1 % BSA überschichtet und anschließend in einer feuchten Kammer mit 20 µl des entsprechenden Antikörper, in geeigneter Verdünnung 30-60 min bei 37°C inkubiert. Der Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen erneut mit 1 % BSA in PBS überschichtet. Anschließend wurde mit 20 µl eines Fluorescein-, bzw. Rhodamin-gekoppelten Sekundäntikörpers, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist, 30-60 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert.

Zur Darstellung von Aktinfilamenten wurde Fluorescein-, bzw. Rhodamin-gekoppeltes Phalloidin, ein Stoffwechselprodukt des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), das hochspezifisch an Aktinfilamente bindet, verwendet. Dazu wurden die Zellen in einer direkten Fluoreszenz mit einer 10 µM Phalloidin-FITC, bzw. -TRITC Lösung inkubiert, wie bereits für die Antikörper beschrieben.

Für Kolokalisationsstudien wurden Doppelfärbungen durchgeführt, indem Primäntikörper aus unterschiedlichen Spezies verwendet wurden, die anschließend von Rhodamin-, bzw. Fluorescein-gekoppelten Antikörpern erkannt wurden.

Zur Einbettung der Fluoreszenzpräparate wurden die Deckgläschen nach den Inkubationen dreimal mit PBS gewaschen und kurz in H₂O geschwenkt. Mowiol + Bleichschutz (3+1) wurde auf einen Objektträger aufgetropft und die Präparate mit den Zellen nach unten eingebettet. Die Präparate wurden 24 h bei RT getrocknet und unter Verwendung geeigneter Filtersätze für Rhodamin und Fluorescein-Färbungen am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Dokumentation wurden mit einer CCD-Kamera Bilder aufgenommen, die Verarbeitung erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop.

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Die den Mäusen entnommenen Organe wurden sofort in kühlem PBS von Bindegewebe, Blut und Fett befreit, abgetropft und in „Polyfreeze tissue freezing mediumTM“ auf Trockeneis eingefroren. Von den gefrorenen Blöcken wurden mit Hilfe eines Cryotoms je nach Gewebe 5-20 µm dicke Schnitte angefertigt.

2.2.4.2 Färbung von Gefrierschnitten

Die Schnitte wurden für mindestens 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend fixiert. Für die Fixierung mit Paraformaldehyd wurden die Schnitte zunächst drei mal mit PBS gewaschen, kurz (10-15 s) mit 1 % Triton-X-100 in PBS extrahiert, erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend fixiert. Dazu wurden die Schnitte mit 4 % Paraformaldehyd überschichtet und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Schnitte zur Extraktion für 30 min bei Raumtemperatur mit 0,2 % Triton-X-100 inkubiert. Die fixierten Schnitte wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h mit 5 % BSA in PBS abgesättigt. Es folgte eine einstündige Inkubation der Schnitte mit α -Maus-IgG-Fab-Fragmenten, um Hintergrund durch Immunglobuline zu reduzieren. Anschließend erfolgte die eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur des in PBS + 5 % BSA verdünnten Erstantikörpers, bzw. des unverdünnten Zellkulturüberstandes. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen entfernt und die Schnitte wurden für 30 min bei 37 °C mit dem ebenfalls in PBS + 5 % BSA verdünnten Zweitantikörper inkubiert. Sie wurden in Mowiol eingebettet und über Nacht bei 37°C getrocknet. Die so behandelten Schnitte wurden am Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert.

3 Ergebnisse

3.1 Konstrukte und Proteinexpression

3.1.1 Klonierung

Die biochemische Charakterisierung von Metavinculin erforderte die Herstellung rekombinanter Proteine. Die eingesetzten Expressionskonstrukte und ihre Klonierung sollen daher im Folgenden kurz vorgestellt werden. Für die Expression rekombinanter Proteine wurde in dieser Arbeit hauptsächlich der Vektor pQE30 benutzt. Bei Verwendung dieses Vektors entsteht in prokaryotischen Zellen (*E.coli* M15, siehe Kapitel 2.1.7.1) ein Fusionsprotein, das N-terminal einen His-„tag“ trägt, über den sich die Proteine spezifisch aufreinigen lassen (siehe Kapitel 2.2.2.7). Zwei der für die Expression eingesetzten Konstrukte wurden freundlicherweise von Dr. Stefan Hüttelmaier zur Verfügung gestellt. Sie enthielten die cDNA für die Aminosäuren 858-1066 der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne in dem prokaryotischen Expressionsvektor pQE30 (siehe Kapitel 2.1.5). Die Konstrukte enthielten zusätzlich N-terminal die Basensequenz für ein FLAG-Epitop-„tag“ (siehe Abbildung 12 A). Die entsprechenden rekombinanten Proteine werden im Folgenden als MVT₈₅₈₋₁₀₆₆, bzw. VT₈₅₈₋₁₀₆₆ bezeichnet. MVT, bzw. VT stehen dabei für die Metavinculin-, bzw. Vinculin-Schwanzdomäne (aus dem englischen abgekürzt für Metavinculin-Tail, bzw. Vinculin-Tail), die Zahlenangaben beziehen sich auf die Aminosäurepositionen. Obwohl Metavinculin aus 1134 Aminosäuren besteht, werden die Aminosäuren innerhalb der Metavinculin-Schwanzdomäne zwecks besserer Übersichtlichkeit entsprechend der Vinculin-Schwanzdomäne nummeriert. Die zusätzlichen Aminosäuren des Metavinculin-Einschubs werden durch ein MVI (Metavinculin-Insert) mit entsprechender Bezeichnung der Aminosäureposition von 1 bis 68 gekennzeichnet.

Nach Expression und Aufreinigung über Nickel-NTA-Agarose lassen sich die hier beschriebenen rekombinanten Fusionsproteine durch einen α -FLAG-Antikörper (siehe Kapitel 2.1.6) nachweisen. Da für einige Experimente verkürzte Konstrukte benötigt wurden, wurde darüber hinaus die cDNA für die Aminosäuren 879-1066 in den Vektor pQE30 kloniert. In diesem Fall wurde auf ein FLAG-Epitop-„tag“ verzichtet. Die entsprechenden rekombinanten Proteine können über einen α -tetra-His-Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12 B). Sie werden im Folgenden als MVT₈₇₉₋₁₀₆₆, bzw. VT₈₇₉₋₁₀₆₆ bezeichnet.

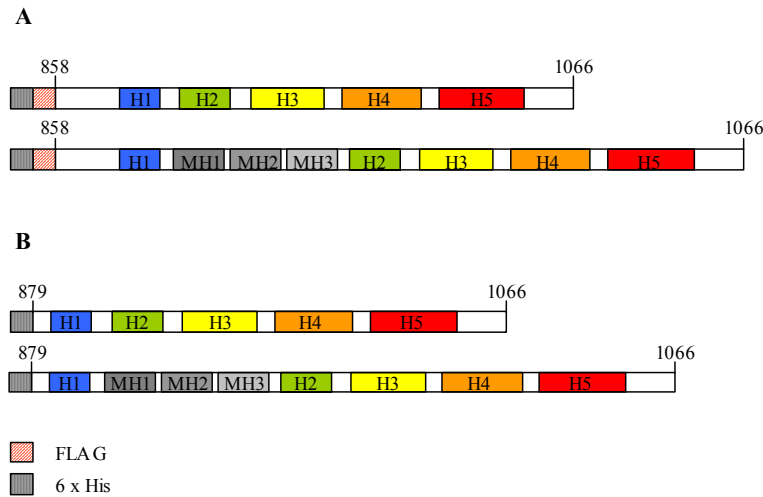


Abbildung 12: Schematische Darstellung der verwendeten (M)VT Expressionskonstrukte

A) HIS/FLAG-(M)VT₈₅₈₋₁₀₆₆, B) HIS-(M)VT₈₇₉₋₁₀₆₆. Dargestellt ist die cDNA der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne mit den N-terminalen Fusionsanteilen. Eingezeichnet sind die helikalen Bereiche (H1-H5) der Vinculin-Schwanzdomäne (Farbgebung nach Bakolitsa et al., 1999). Die Metavinculin-Konstrukte unterscheiden sich durch einen Einschub von 204 Basenpaaren zwischen den für die α -Helices 1 und 2 codierenden cDNA-Abschnitten. Im Protein ist der Einschub vermutlich zu 3 α -Helices gefaltet (MH1-MH3).

Basierend auf dem Konstrukt MVT₈₅₈₋₁₀₆₆ wurden über Mutagenese einige der sauren Aminosäuren des Metavinculin-Einschubs durch strukturverwandte neutrale Aminosäuren ersetzt (Asparaginsäure \rightarrow Asparagin, Glutaminsäure \rightarrow Glutamin). Saure Aminosäuren häufen sich insbesondere innerhalb der vorausgesagten α -Helix 2 des Metavinculin-Einschubs (Abbildung 18). Bei der Mutagenese lag besonderes Augenmerk auf solchen sauren Aminosäuren, die nach einer „helical-wheel“-Analyse auf einer Seite der vorhergesagten Helices gehäuft vorlagen (Abbildung 13).

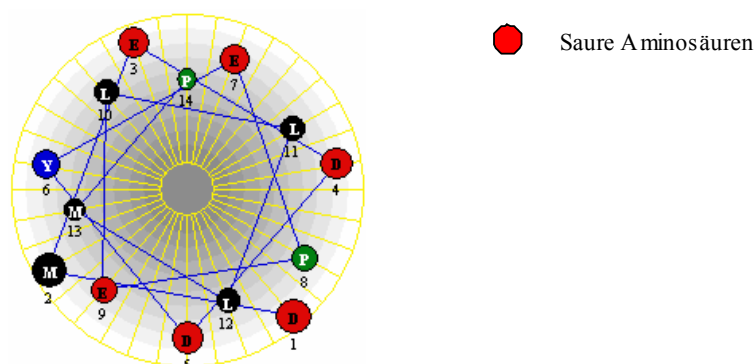


Abbildung 13: „Helical Wheel“ – Darstellung der vorausgesagten α -Helix 2 des Metavinculin-Einschubs.

Die nach dem Einbuchstabencode bezeichneten Aminosäuren sind in N \rightarrow C Orientierung nummeriert und entsprechend einer α -Helix angeordnet. Die Größe der Kreise um die Aminosäuren reflektiert die Entfernung zum Betrachter. Saure Aminosäuren sind rot hinterlegt. Sie häufen sich auf zwei Seiten der Helix.

Abbildung 14 zeigt den Metavinculin-Einschub dieser Ladungsmutanten im Vergleich zur Wildtypsequenz. Diese Ladungsmutanten der Metavinculin-Schwanzdomäne werden weiterhin vereinfachend mit MVT-NNQ₈₅₈₋₁₀₆₆ und MVT-QNQ₈₅₈₋₁₀₆₆ bezeichnet.

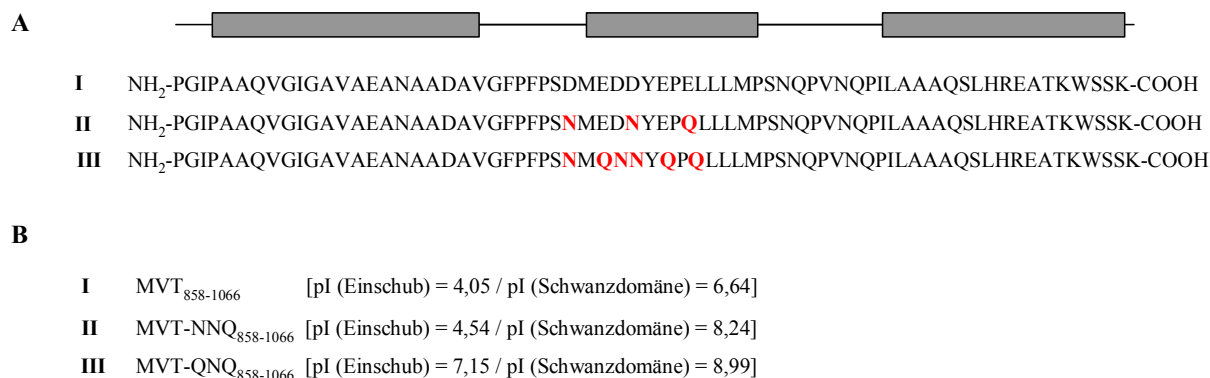


Abbildung 14: Aminosäuresequenz des wt-Metavinculin-Einschubs im Vergleich mit zwei durch Mutagenese erzeugten Aminosäuresequenzen (MVT-NNQ₈₅₈₋₁₀₆₆, MVT-QNQ₈₅₈₋₁₀₆₆)

A) zeigt den Metavinculin-Einschub der mutierten Metavinculin-Schwanzdomänen (II, III) im Vergleich zur Wildtypsequenz (I). Die Aminosäureaustausche beschränken sich auf die hochkonservierte α -Helix 2 des Metavinculin-Einschubs, wie durch die grauen Balken symbolisiert. Die neu eingebrachten Aminosäuren sind rot hervorgehoben. B) fasst die Bezeichnungen der mutierten Metavinculin-Schwanzdomänen und die entsprechenden isoelektrischen Punkte von Metavinculin-Einschub, bzw. Schwanzdomäne zusammen. Durch die Einführung neutraler Aminosäuren ändert sich der isoelektrische Punkt der entsprechenden Metavinculin-Schwanzdomäne drastisch.

Für die „Yeast Two-Hybrid“ Experimente wurden Konstrukte der Metavinculin-, bzw. Vinculin-Schwanzdomäne in dem Vektor pGBKT7 (Clontech, siehe Kapitel 2.2.2.16) verwendet. Sie entsprechen den wt-Expressionskonstrukten und werden daher als MVT / VT₈₅₈₋₁₀₆₆, bzw. MVT / VT₈₇₉₋₁₀₆₆ bezeichnet. Darüber hinaus kam im Rahmen des „Yeast Two-Hybrid“ Systems noch ein weiteres, kürzeres Konstrukt zum Einsatz. Es umfasst lediglich die Sequenz für die Helices 1 und 2 und im Falle des Metavinculin-Konstruktes zusätzlich die Sequenz für den Metavinculin-Einschub (siehe Kapitel 3.2). Es wird entsprechend den Aminosäurepositionen mit MVT₈₅₈₋₉₄₂ bezeichnet.

3.1.2 Proteinaufreinigung

Die rekombinanten Proteine wurden bakteriell exprimiert und anschließend über ihren His-Fusionsanteil spezifisch aufgereinigt wie in Kapitel 2.2.2.7 angegeben. Die am häufigsten eingesetzten rekombinanten Proteine finden sich mit allen relevanten Angaben in Tabelle 6.

Tabelle 6: Zusammenfassung aller relevanten Daten für die am häufigsten eingesetzten rekombinanten (Meta)Vinculin-Schwanzproteine

Detaillierte Angaben zu den entsprechenden Expressionskonstrukten finden sich in Kapitel 3.1.1. AS: Aminosäuren, MW: Molekulargewicht

Konstrukt	AS	„tag“	MW berechnet (apparent)
VT ₈₅₈₋₁₀₆₆	858-1066	His, FLAG (N-terminal)	25,5 (~30)
MVT ₈₅₈₋₁₀₆₆	858-1066	His, FLAG (N-terminal)	32,6 (~40)
MVT-NNQ ₈₅₈₋₁₀₆₆	858-1066	His, FLAG (N-terminal)	30,5 (~40)
MVT-QNQ ₈₅₈₋₁₀₆₆	858-1066	His, FLAG (N-terminal)	30,5 (~40)
VT ₈₇₉₋₁₀₆₆	879-1066	His (N-terminal)	23,0 (~25)
MVT ₈₇₉₋₁₀₆₆	879-1066	His (N-terminal)	29,9 (~35)

Neben den rekombinanten (Meta)Vinculin-Schwanzdomänen kamen auch aus Putenmagen über eine FPLC aufgereinigte Vinculin, bzw. Metavinculingesamtproteine für einige Versuche zum Einsatz (zur Verfügung gestellt von Dr. Stefan Hüttelmaier). Abbildung 15 zeigt eine SDS-PAGE aller im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rekombinanten oder aus Gewebe aufgereinigten Proteine. Alle Proteine kamen im Verlauf der Arbeit für unterschiedliche Versuche zur Verwendung, nicht alle sind jedoch für die hier vorgestellten Ergebnisse relevant. Wie die SDS-PAGE-Analyse zeigt, konnten alle verwendeten Proteine ohne signifikanten Hintergrund aufgereinigt werden. Alle Metavinculin-Proteine verhielten sich über längere Zeiträume deutlich instabiler als die entsprechenden Vinculin-Proteine, zu erklären vermutlich durch die Präsenz einiger zusätzlicher Proteaseschnittstellen (siehe Kapitel 1.2). Auch mit den Metavinculin-Proteinen war dennoch meistens ein Arbeiten über einen Zeitraum von etwa zwei Wochen möglich.



Abbildung 15: Gelelektrophoretische Auftrennung aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten und/oder verwendeten Proteine

Die Zahlenangaben am oberen Rand der Abbildung verweisen auf folgende Proteine (die für die hier vorgestellten Ergebnisse relevanten Proteine sind fett hinterlegt):

1) VT₈₅₈₋₁₀₆₆, 2) MVT₈₅₈₋₁₀₆₆, 3) MVT-NNQ₈₅₈₋₁₀₆₆, 4) MVT-QNQ₈₅₈₋₁₀₆₆, 5) VT₈₇₉₋₁₀₆₆, 6) MVT₈₇₉₋₁₀₆₆, 7) VT₈₂₈₋₁₀₆₆, 8) MVT₈₂₈₋₁₀₆₆, 9) MBP-VT₈₅₈₋₁₀₆₆, 10) MBP-MVT₈₅₈₋₁₀₆₆, 11) Vinculin, 12) Metavinculin

3.1.3 CD-Spektren

CD-Spektroskopie ist eine Methode, mit deren Hilfe man Hinweise auf die Sekundärstruktur von Proteinen gewinnen kann, denn α -Helices, β -Faltblätter und ungefaltete Polypeptidketten unterscheiden sich deutlich in der Absorption polarisierten Lichtes (siehe Abbildung 16 A). Um Einblick in die Sekundärstrukturen der für die vergleichende biochemische Charakterisierung eingesetzten rekombinanten Proteine zu erhalten, wurden CD-Spektren der Proteine (VT₈₅₈₋₁₀₆₆, MVT₈₅₈₋₁₀₆₆, MVT-NNQ₈₅₈₋₁₀₆₆, MVT-QNQ₈₅₈₋₁₀₆₆, vgl. Abbildung 15) aufgezeichnet und mit den in Abbildung 16 A abgebildeten Spektren verglichen. Die laut Röntgenstrukturanalyse aus 5 α -Helices bestehende Vinculin-Schwanzdomäne (siehe Kapitel 1.1.2) zeigte wie erwartet ein für ein aus α -Helices bestehendes Protein typisches CD-Spektrum (Abbildung 16 B). Die Metavinculin-Schwanzdomäne unterscheidet sich von der Vinculin-Schwanzdomäne nur durch einen Einschub zwischen den α -Helices 1 und 2, der laut Strukturvorhersage ebenfalls zu drei α -Helices gefaltet ist (Kapitel 1.2.1). Sie besteht somit vermutlich ebenfalls zu großem Teil aus α -helikalen Bereichen, was sich in ihrem CD-Spektrum auch deutlich zeigt (Abbildung 16 B).

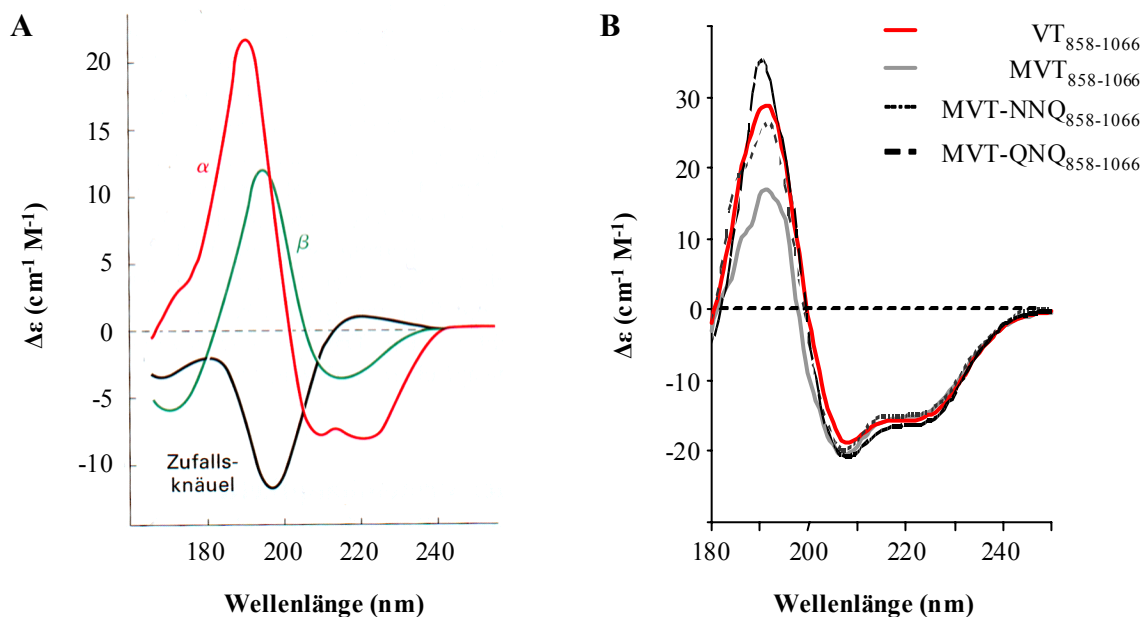


Abbildung 16: Vergleichende CD-Spektren der für biochemische Untersuchungen eingesetzten (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne

A) Typische CD-Spektren eines aus α -Helices, bzw. β -Faltblättern aufgebauten Proteins und einer ungefalteten Polypeptidkette (entnommen aus Stryer: Lehrbuch der Biochemie) B) Vergleichende CD-Spektralanalyse von VT₈₅₈₋₁₀₆₆, MVT₈₅₈₋₁₀₆₆, MVT-NNQ₈₅₈₋₁₀₆₆ und MVT-QNQ₈₅₈₋₁₀₆₆. Die für biochemische Untersuchungen eingesetzten Konstrukte weisen ähnliche Sekundärstrukturen auf. Auch Mutanten innerhalb des Metavinculin-Einschubs beeinflussen die Sekundärstrukturen nicht.

Auch die Einführung von Aminosäuremutationen innerhalb der Helix 2 des Metavinculin-Einschubs nimmt offensichtlich keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur der entsprechenden rekombinanten Schwanzdomänen (Abbildung 16 B, MVT-NNQ₈₅₈₋₁₀₆₆, MVT-QNQ₈₅₈₋₁₀₆₆). Die Spektren der untersuchten rekombinanten Schwanzdomänen weisen im vorderen Teil Divergenzen auf, deren Ursache sich nicht klären ließ, zumal eine Auswertung der Spektren mittels der Programme „Spectra Analyzer“ und „DiCroProt“ (Jasco Systems) nahezu identische Werte für den prozentualen Anteil an α -Helices bzw. β -Faltblättern ergab. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Auswertung der CD-Spektralanalyse für VT₈₅₈₋₁₀₆₆, MVT₈₅₈₋₁₀₆₆, MVT-NNQ₈₅₈₋₁₀₆₆ und MVT-QNQ₈₅₈₋₁₀₆₆

	α -Helices (%)	β -Faltblätter (%)
VT ₈₅₈₋₁₀₆₆	33,8	7,2
MVT ₈₅₈₋₁₀₆₆	29,6	7,3
MVT-NNQ ₈₅₈₋₁₀₆₆	29,4	7,7
MVT-QNQ ₈₅₈₋₁₀₆₆	31	7,6

Wenn auch die Tertiärstrukturen beider Proteine nicht ohne Weiteres überprüft werden können, ist den CD-Spektren zu entnehmen, dass die rekombinanten Polypeptidketten nicht willkürlich gefaltet vorlagen, sondern eine vorwiegend α -helikale Sekundärstruktur aufwiesen, die nach röntgenkristallographischen Daten auch zu erwarten war. Dies ist von entscheidender Bedeutung für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten biochemischen Eigenschaften der Proteine (Kapitel 3.4).

3.2 „Yeast Two-Hybrid“ Analysen

Zur Identifikation möglicher neuer, Metavinculin-spezifischer Liganden wurden unter Einsatz von Konstrukten der Metavinculin-Schwanzdomäne „Yeast Two-Hybrid Screens“ durchgeführt. Mit Hilfe des Konstruktes MVT₈₅₈₋₁₀₆₆ (Kapitel 3.1) konnten bekannte Liganden von Vinculin auch als Metavinculin-Bindungspartner identifiziert werden (Tabelle 8). Es handelt sich um die SH3-Proteine Ponsin, ArgBP2 und Vinexin, deren Bindung an Vinculin beschrieben, deren zelluläre Funktion hingegen noch unbekannt ist (Kawabe et al., 1999; Kioka et al., 1999; Mandai et al., 1999). Da es sich bei diesen Proteinen jedoch ausschließlich um Liganden handelt, die Vinculin innerhalb der Scharnierregion binden, wurde vermutet, dass die Metavinculin-Schwanzdomäne in Hefezellen möglicherweise in einer Konformation vorliegt, die eine selektive Bindung an spezifische (Meta)Vinculin-Schwanzliganden verhindert. Wie in Kapitel 4.2.2 diskutiert, ist möglicherweise die Entfaltung der Schwanzdomäne ein im Rahmen der Aktivierung der Ligandenbindungsstellen kritischer Schritt. Aus diesem Grund wurden die Genbanken erneut unter Einsatz kürzerer Konstrukte, die lediglich die α -Helices 1 und 2 der Schwanzdomäne und dem Metavinculin-Einschub bestanden (MVT₈₅₈₋₉₄₂, Abbildung 17), durchsucht. Auch bei diesen Untersuchungen konnten jedoch keine neuen Metavinculin-spezifischen Liganden identifiziert werden.

Viele potentielle Metavinculin-Liganden zeigten in der Kontrolle mit einem Kontrollvektor, der eine Sequenz des Kernlamins C enthält (pGBKT7-lam, Clontech) ebenfalls eine Interaktion oder wiesen ein falsches Leseraster auf (in Tabelle 8 exemplarisch für das häufig identifizierte Snare-assoziierte Protein Snapin und das große Strukturprotein β -Spectrin gezeigt). Für die „Yeast Two-Hybrid“ Analysen wurden drei verschiedene Genbanken verwendet, um eine möglichst große Bandbreite gewebspezifisch exprimierter Proteine zu erfassen.

Tabelle 8: Ergebnis von Y2H-Interaktionsuntersuchungen verschiedener potentieller Metavinculin-Liganden

LR: Leseraster, Lam: pGBKT7-lam (Negativkontrolle, Clontech), +: Interaktion im Y2H, -: keine Interaktion im Y2H, NU: Nicht untersucht

	Anzahl	LR	MVT ₈₅₈₋₁₀₆₆	VT ₈₅₈₋₁₀₆₆	Lam
ArgBP2	13x	Ok	+	+	-
Ponsin	4x	Ok	+	+	-
Vinexin	8x	Ok	+	+	-
Snare associated protein (snapin)	12x	Ok	-	-	+
β-Spectrin	1x	Falsch	NU	NU	NU

Die Durchsuchung der Genbanken mit den verkürzten Metavinculin-Konstrukten im „Yeast Two-Hybrid“ System erbrachte jedoch die Bestätigung einer bereits vermuteten intramolekularen Bindung innerhalb der Metavinculin-Schwanzdomäne, denn für ein MVT-Konstrukt, das die Helix 1 und 2 sowie den Metavinculin-Einschub der Metavinculin-Schwanzdomäne umfasste, wurde in der Genbank ein nicht überlappendes Fragment der Vinculin-Schwanzdomäne (Helices 4 und 5) als Bindungspartner identifiziert (Abbildung 17). Diese Bindung ist offenbar nicht Metavinculin-spezifisch, denn auch mit einem entsprechenden Vinculin-Fragment konnte eine Interaktion gezeigt werden.

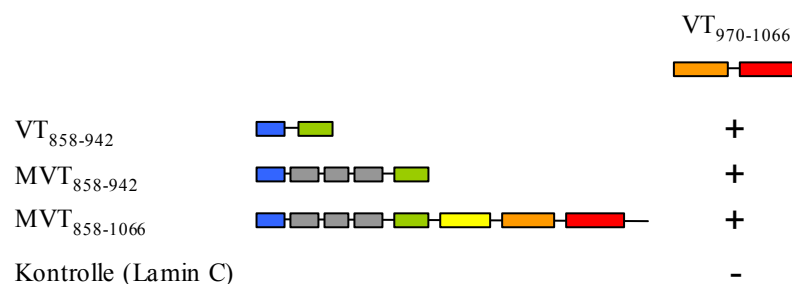


Abbildung 17: Schematische Darstellung einer mit dem „Yeast Two-Hybrid“ System bestätigten intramolekularen Wechselwirkung innerhalb der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne

Für das Konstrukt MVT₈₅₈₋₉₄₂ wurde ein Fragment der Vinculin-Schwanzdomäne, das die Helices 4 und 5 (orange/rot) enthält, als Bindungspartner identifiziert. Das Fragment bindet auch an ein entsprechendes Vinculin-Konstrukt (VT₈₅₈₋₉₄₂) und an MVT₈₅₈₋₁₀₆₆. Die farbigen Kästen symbolisieren α-helikale Bereiche der Vinculin-Schwanzdomäne (Farbgebung entsprechend Abbildung 3), die grauen Kästen stehen für die vorhergesagten α-Helices des Metavinculin-Einschubs, + / - geben eine im „Yeast Two-Hybrid“ System vorhandene, bzw. fehlende Interaktion an.

Die umfangreichen „Yeast Two-Hybrid“ Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf spezifische Metavinculin-Liganden. Die Suche nach neuen Liganden wurde aus diesem Grund zu Gunsten einer zellulären und biochemischen Charakterisierung von Metavinculin abgebrochen.

3.3 Zelluläre Analysen

3.3.1 Charakterisierung Metavinculin-spezifischer Antikörper

Grundlage für die Charakterisierung Metavinculins mittels biochemischer und zellbiologischer Arbeitsmethoden ist das Vorliegen Metavinculin-spezifischer Antikörper. Zur Herstellung monoklonaler Metavinculin-spezifischer Antikörper wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Für die Immunisierung von Mäusen diente einerseits ein kurzes synthetisch hergestelltes Peptid (17 Aminosäuren, Sequenz: VNQPILAAAQSLHREAT, vgl. Abbildung 18) aus dem Metavinculin-Einschub, andererseits die rekombinant aufgereinigte Metavinculin-Schwanzdomäne (MVT₈₇₉₋₁₀₆₆, siehe Kapitel 3.1). Die Immunisierung der Mäuse, Fusion der Lymphocyten mit Myelomzellen und Selektion der Hybridomzellen wurde von Sabine Buchmeier durchgeführt. Die monoklonalen Antikörper wurden in Form von Zellkulturüberständen zur Verfügung gestellt und wurden zunächst auf ihre Spezifität für Metavinculin untersucht. Dies erfolgte im Western-Blot vergleichend für rekombinant aufgereinigte Vinculin-, bzw. Metavinculin-Schwanzdomäne (MVT₈₇₉₋₁₀₆₆ / VT₈₇₉₋₁₀₆₆, siehe Kapitel 3.1.2). Mit Hilfe von PepScan-Membranen (Kapitel 2.2.2.4) sollten anschließend die Epitope der Metavinculin-spezifischen Antikörper kartiert werden. Die PepScan-Membranen wurden freundlicherweise von Dr. Ronald Frank (GBF Braunschweig) hergestellt. Sie enthielten in Form überlappender, 15 Aminosäuren großer Peptide die gesamte Aminosäuresequenz des Metavinculin-Einschubs. Die Membranen wurden mit den zu kartierenden Antikörpern inkubiert und einer AP-Entwicklung (siehe Kapitel 2.2.2.3.1) unterzogen. Die Ergebnisse der Epitopkartierung sind in Abbildung 18 zusammengefasst:

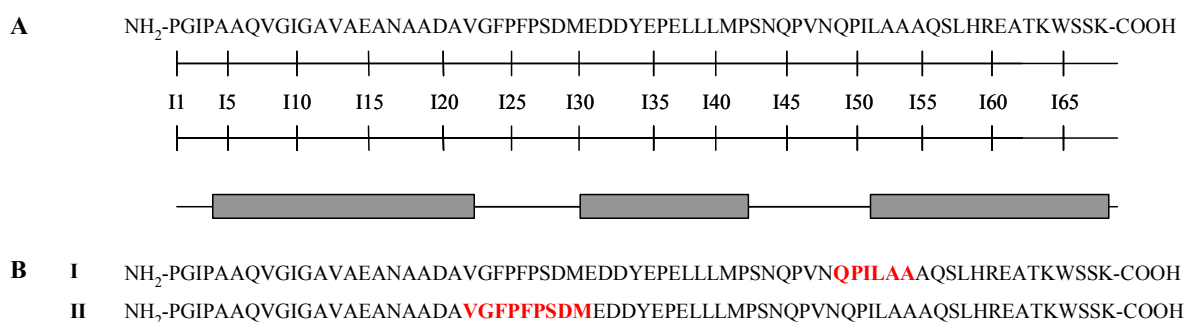


Abbildung 18: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Epitopkartierung Metavinculin-spezifischer Antikörper

A) Aminosäuresequenz des Metavinculin-Einschubs der Maus. Die Balken stellen die Bereiche der vorausgesagten α -helikalen Regionen dar. B) Die Ergebnisse der Epitopkartierung für α -MVI-Peptidantikörper (I) bzw. α -MVT-Antikörper. Die Epitope sind jeweils innerhalb der MVI-Sequenz in rotem Fettdruck hervorgehoben. Das unter B I) dargestellte Epitop wird von dem α -MVI-Antikörper 6E3 erkannt, an das unter B II) gezeigte Epitop bindet der Großteil der α -MVT₈₇₉₋₁₀₆₆-Antikörper (siehe Text)

Die überwiegende Mehrheit der α -MVT₈₇₉₋₁₀₆₆-Überstände (5B2, 3E5, 1H1, 1A12, 5B5, 2C6, 3E10, 3E11, 1A6, 1A2, 1E5) erkannte eine kurze Aminosäuresequenz, die in einer Region zwischen den ersten beiden Helices des Metavinculin-Einschubs liegt (siehe Abbildung 18 B II). Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine in der Metavinculin-Schwanzdomäne besonders exponierte und somit für Antikörper leicht zugängliche Schleifenregion. Lediglich einer der getesteten Antikörper (1B9) erkannte schwach eine Region innerhalb der vorhergesagten zweiten Helix des Metavinculin-Einschubs (nicht gezeigt).

Das Epitop der gegen aus dem Metavinculin-Einschub (MVI) stammende synthetische Peptide hergestellten Antikörperüberstände (6E3) konnte ebenfalls mit Hilfe der PepScan-Membran auf eine kurze Aminosäuresequenz eingegrenzt werden (siehe Abbildung 18 B I). Da es sich um ein synthetisches Peptid handelte, lassen sich hier keine Schlüsse über die Exposition der entsprechenden Region innerhalb der Metavinculin-Schwanzdomäne ziehen.

Da es für die Verwendung der Antikörperüberstände, insbesondere bei der Untersuchung der Lokalisation von Metavinculin auf Gefrierschnitten essentiell ist, dass es zu keinerlei Kreuzreaktion mit Vinculin kommt, wurden die Überstände nochmals mittels eines Kompetitionstests im ELISA (Kapitel 2.2.2.5) untersucht. Hierzu wurden gleiche Mengen der Vinculin- und der Metavinculin-Schwanzdomäne an eine ELISA-Platte (Nunc Polysorb) gebunden und mit den zu charakterisierenden Metavinculin-Antikörpern inkubiert. Zum eindeutigen Nachweis der Spezifität wurden die Antikörper zusätzlich mit steigenden molaren Überschüssen eines zum Epitop des zu untersuchenden Antikörpers passenden synthetisch hergestellten Peptids (Abbildung 18) präinkubiert. Abbildung 19 dokumentiert die Ergebnisse dieser Untersuchungen exemplarisch am Beispiel des α -Metavinculin-Antikörpers 6E3 (s.o.).

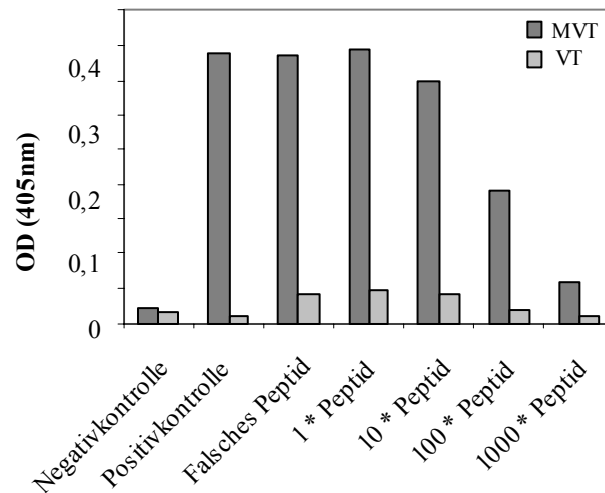


Abbildung 19: Spezifitätsnachweis der verwendeten α -Metavinculin-Antikörper im ELISA (exemplarisch für den α -MVI-Peptidantikörper 6E3)

VT wird von den verwendeten α -Metavinculin-Antikörpern nicht erkannt. Wird der Antikörper mit einem dem Epitop entsprechenden Metavinculin-Peptid präinkubiert, nimmt auch das Signal für MVT entsprechend ab. Negativkontrolle: ohne (M)VT, Positivkontrolle: ohne Präinkubation des Antikörpers mit dem Peptid, Falsches Peptid: Präinkubation des Antikörpers mit einem nicht zum Epitop passenden, aber ebenfalls aus dem Metavinculin-Einschub stammenden Peptid, 1-1000 * Peptid: 1-1000-facher molarer Überschuss des zum Epitop passenden Peptids.

Während die Antikörper eine deutliche Bindung an die immobilisierte Metavinculin-Schwanzdomäne aufwiesen, wurde für die Vinculin-Schwanzdomäne lediglich ein basales Signal nachgewiesen. Die Bindung an MVT konnte selektiv durch Präinkubation des Antikörperüberstandes mit steigenden Mengen eines dem Epitop des Antikörpers entsprechenden Peptids deutlich reduziert werden. Mit einem unspezifischen Peptid konnte dieser Effekt nicht erzielt werden. Dies beweist, dass es sich bei den verwendeten Antikörpern tatsächlich um hochspezifische Metavinculin-Antikörper handelt.

3.3.2 Transfektionsexperimente

Bei der Untersuchung der Lokalisation von Metavinculin in kultivierten Zellen besteht das Problem, dass viele der aus ursprünglich Metavinculin-exprimierenden Zelltypen gewonnenen Zelllinien in Kultur dedifferenzieren und die Expression von Metavinculin stark herunterregulieren. Sie enthalten daher kaum oder kein endogenes Metavinculin. Aus diesem Grund war die Untersuchung Metavinculins in kultivierten Zellen ausschließlich nach Transfektion eines entsprechenden cDNA-Konstruktes möglich. Zur Untersuchung von Metavinculin in kultivierten Zellen wurde die cDNA murinen (Meta)Vinculins in die eukaryotischen Expressionsvektoren pcDNA3-BiPro und pEGFP-C2 (siehe Kapitel 2.1.5) kloniert. Nach der Transfektion entsteht im Falle des pEGFP-C2-(Meta)Vinculin-Konstruktes ein rekombinantes Fusionsprotein, das N-terminal einen EGFP („enhanced green fluorescent protein“-Fusionsanteil (Clontech) trägt. Dies ermöglicht den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis Metavinculins ohne den Einsatz spezifischer Antikörper und ermöglicht des Weiteren die Charakterisierung der unter Kapitel 3.3.1 beschriebenen monoklonalen α -Metavinculin-Antikörper in Kulturzellen. Bei Transfektion des pcDNA3-BiPro-Metavinculin-Konstruktes trägt das entstehende Fusionsprotein einen N-terminalem BiPro-Fusionsanteil (siehe Kapitel 2.1.5). Die Proteine können in diesem Fall über einen α -BiPro-Antikörper (Kapitel 2.1.6) nachgewiesen werden (Rüdiger et al., 1997; Wiedemann et al., 1996). Die Konstrukte wurden wie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben in C2C12-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden fixiert und nach entsprechenden Färbungen fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Mit Hilfe solcher Transfektionsexperimente sollte die Spezifität der für immunhistologische Untersuchungen verwendeten α -Metavinculin-Antikörper *in vivo* nachgewiesen werden. Dazu wurden C2C12-Zellen (siehe Kapitel 2.1.7.3) jeweils mit einem pEGFP-C2-Metavinculin, bzw. – Vinculinkonstrukt transfiziert und mit den zu untersuchenden α -Metavinculin-Antikörpern für die Fluoreszenzmikroskopie angefärbt. Mit den für die Gefrierschnitte verwendeten α -Metavinculin-Antikörpern ist nur GFP-Metavinculin, nicht jedoch GFP-Vinculin detektierbar (siehe Abbildung 20, exemplarisch für den α -MVI-Antikörper 6E3). Dies zeigt die Spezifität der α -Metavinculin-Antikörper auch in Zellkulturen.

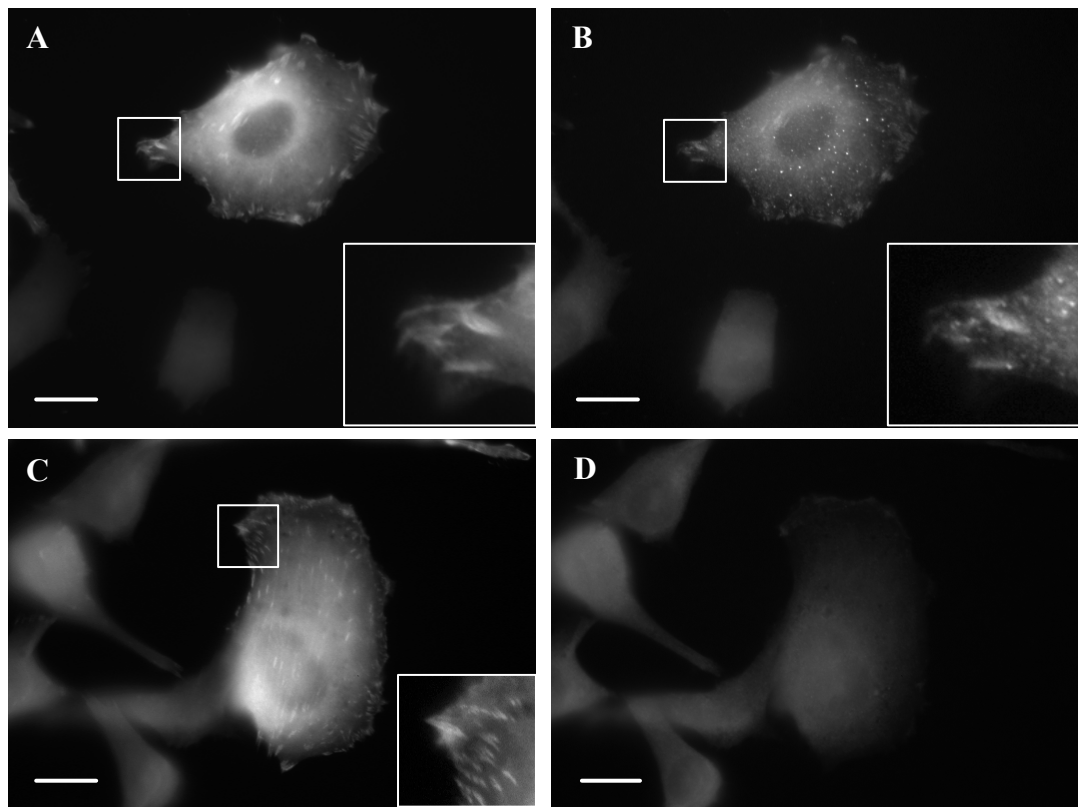


Abbildung 20: Spezifitätsnachweis des α -Metavinculin-Antikörpers 6E3 in mit pEGFP-C2-(Meta)Vinculin transfizierten C2C12-Zellen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Der α -Metavinculin-Antikörper 6E3 erkennt in transfizierten Zellen spezifisch Metavinculin (A, B), nicht jedoch Vinculin (C, D). A) GFP-Metavinculin B) 6E3-Färbung C) GFP-Vinculin D) 6E3-Färbung; Balken: 10 μ m.

In transfizierten C2C12-Zellen ist Metavinculin in Fokalkontakten, d.h. an den Enden von Aktinfilamentbündeln lokalisiert. Dies ist sowohl für GFP-Metavinculin (siehe Abbildung 21) als auch für BiPro-Metavinculin (nicht gezeigt) der Fall. Darüber hinaus ist bei beiden Konstrukten besonders in dickeren, zellkernnahen Regionen der Zelle eine cytoplasmatische, nicht spezifisch lokalisierte Färbung sichtbar, die vermutlich den cytoplasmatischen „Pool“ des Proteins darstellt. Ein identisches Bild ergibt sich bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von mit entsprechenden Vinculinkonstrukten transfizierten Zellen (nicht gezeigt). Weder bezüglich der cytoplasmatischen Färbung, noch in Bezug auf Form oder Größe der Fokalkontakte sind Unterschiede feststellbar. Nicht zu entnehmen ist diesen Experimenten, inwieweit Metavinculin in transfizierten Zellen mit endogenem Vinculin in Fokalkontakten interagiert. Mit dieser Thematik befasst sich unter anderem Kapitel 3.4.

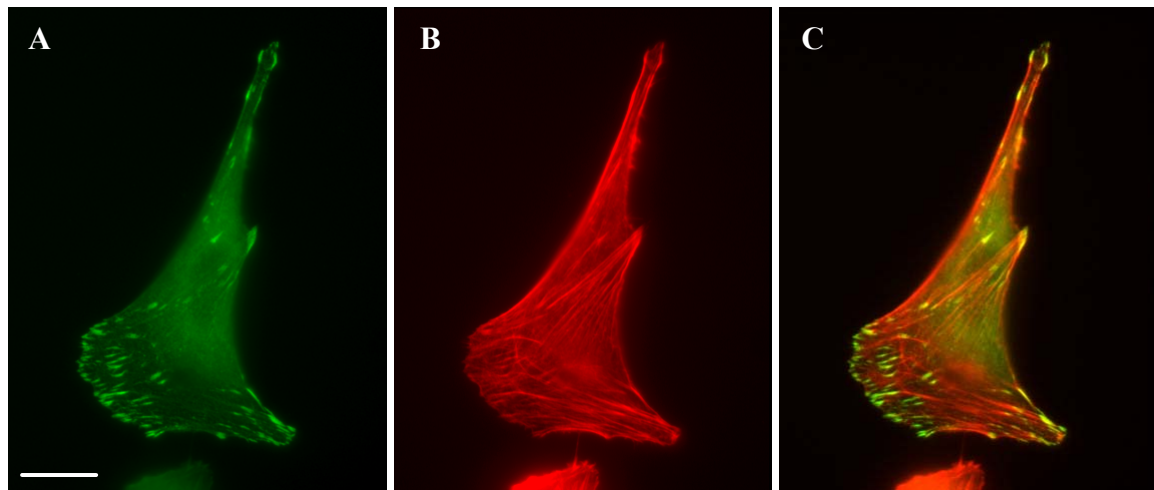


Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mit pEGFP-C2-Metavinculin transfizierten C2C12-Zellen

A) GFP-Metavinculin B) Phalloidin-TRITC C) Übereinanderlagerung In transfizierten Zellen ist Metavinculin in Fokalkontakten lokalisiert, die mit dem Aktin-Cytoskelett verbunden sind. Balken: 10 μ M

3.3.3 Expression von Metavinculin in Muskelgewebe

3.3.3.1 Quantitative Analyse

Während Vinculin in vielen Organismen „ubiquitär“ exprimiert wird, ist die Expression von Metavinculin auf Muskelgewebe beschränkt (Feramisco et al., 1982). Da in der Literatur jedoch widersprüchliche Angaben über die genaue gewebspezifische Expression von Metavinculin existieren (vgl. Kapitel 1.2.2.1), sollte diese mit Metavinculin-spezifischen Antikörpern nochmals untersucht werden.

Dazu wurden unter verschiedenen Extraktionsbedingungen Gewebeextrakte aus Muskelgewebe von Ratten und Mäusen hergestellt (Kapitel 2.2.2.15) und in Western-Blots unter Verwendung des Vinculin-Kopf-spezifischen Antikörpers hVin1 (siehe Kapitel 2.1.6) auf die Expression beider Vinculin-Isoformen hin untersucht. Nach der Entwicklung wurden die Blots densitometrisch ausgewertet. Bei den entnommenen Muskelgeweben handelte es sich um Herz, Blase, Uterus, *M. soleus* (ein langsamer Skelettmuskel) und *M. gastrocnemius* (ein schneller Skelettmuskel). Die Ergebnisse der Western-Blots sind in Abbildung 22 dargestellt, Tabelle 9 fasst die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung zusammen. Wie bereits für humanes Gewebe beschrieben (Belkin et al., 1988b), erreicht Metavinculin auch in Glattmuskelgewebe von Maus und Ratte die höchsten Expressionsraten. Den Blots zufolge umfasst der Metavinculinanteil im Uterus 30-40 % der Gesamtvinculinexpression (Vinculin + Metavinculin; siehe Abbildung 22 A), in der Blase liegt er mit

bis zu 65 % sogar noch darüber (nicht gezeigt). Überraschenderweise wird Metavinculin jedoch offensichtlich auch in schnellen Skelettmuskeln von Mäusen und Ratten mit bis zu 20 % des Gesamtvinculins recht stark exprimiert (Abbildung 22 B). Schwächer ist die Expression von Metavinculin hingegen in langsamen Skelettmuskeln, hier liegt der Metavinculinanteil am Gesamtvinculin bei rund 5 % (Abbildung 22 B). Bisher konnte Metavinculin in Skelettmuskeln nur sehr schwach (Belkin et al., 1988b; Feramisco et al., 1982), bzw. etwas stärker nach mechanischer Belastung der Muskulatur nachgewiesen werden (Chopard et al., 2002; siehe auch Kapitel 1.2.2.1). Wenngleich die Expressionsstärke von Metavinculin im Herzen kontrovers diskutiert wird, erbrachte die Auswertung der Metavinculinexpression in Herzextrakten von Mäusen und Ratten das wohl überraschendste Ergebnis: Hier war Metavinculin nur schwach nachweisbar und erreichte höchstens Werte von 2,6 % der Gesamtvinculinexpression (Abbildung 22 A).

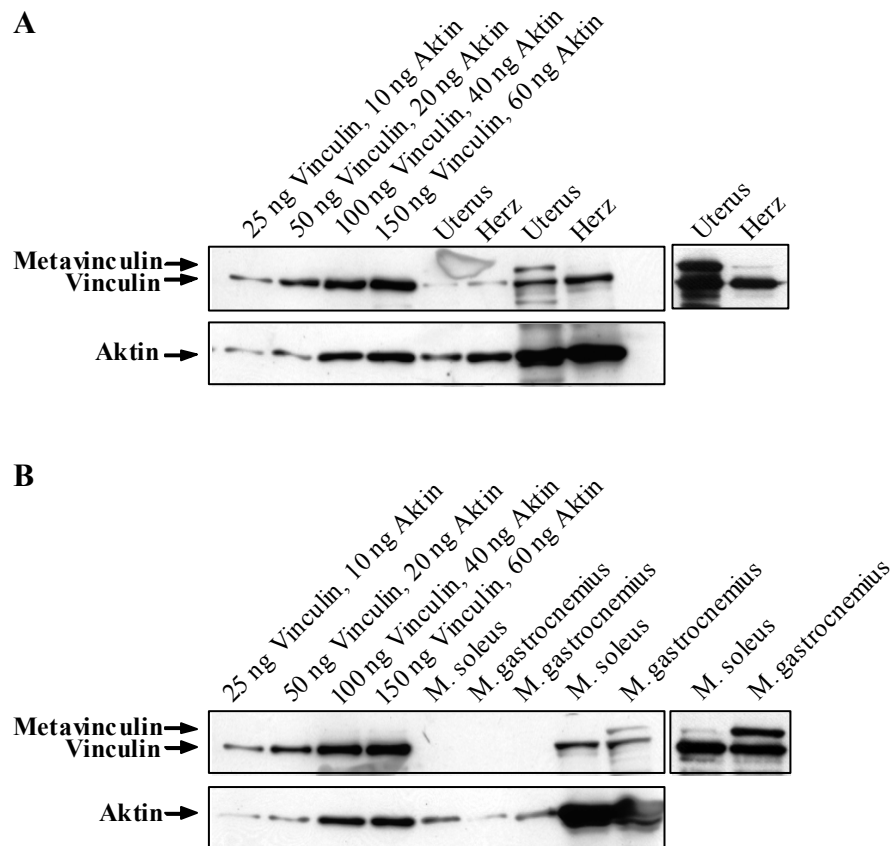


Abbildung 22: Quantifizierung der Expression von Metavinculin bezogen auf den Aktingehalt in verschiedenen Muskelgeweben

Western-Blot-Analyse unter Verwendung des Kopfspezifischen α -(Meta)Vinculin-Antikörpers hVin1 (obere Reihen) bzw. eines polyklonalen α -Aktin-Antikörpers (untere Reihen). A) Glatt- und Herzmuskelextrakte, B) Skelettmuskelgewebeextrakte. Zur quantitativen Auswertung wurden zusätzlich definierte Mengen aufgereinigten Vinculins, bzw. Aktins aufgetragen (Spuren 1-4). Der kleine Kasten rechts zeigt einen länger entwickelten Blot der jeweils letzten beiden Spuren. Metavinculin wird stark in Glattmuskelgewebe exprimiert, schwächer in schnellen Skelettmuskeln und nur sehr schwach in langsamen Skelettmuskeln sowie im Herzen.

Meist war Metavinculin sowohl im Herzen, als auch im *M. soleus* nur bei deutlich verlängerter Exposition des Blots während der ECL-Entwicklung nachweisbar (Abbildung 22, kleine Kästen rechts). Dass diese schwachen Signale nicht auf eine schlechtere Extrahierbarkeit Metavinculins aus den entsprechenden Muskelzellen zurückzuführen sind, zeigen RT-PCR-Analysen. Auch in diesen Untersuchungen ist Metavinculin-mRNA im Herzen nur schwach nachweisbar (persönliche Mitteilung Manuela Fabienke).

Um Aussagen darüber treffen zu können, ob Metavinculin in Glatt- und Skelettmuskelgewebe zusätzlich zu Vinculin exprimiert wird oder ob in diesen Geweben die Gesamtvinculinexpression derjenigen in Geweben ohne Metavinculin entspricht, wurde mit Hilfe zweier Eichstandards mit definierten Mengen von aufgereinigtem Vinculin, bzw. Aktin die Menge von Vinculin/Metavinculin in den untersuchten Gewebeextrakten bezogen auf den jeweiligen Aktiningehalt quantifiziert. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Western-Blots nach der Entwicklung mit dem (Meta)Vinculin-Kopfspezifischen Antikörper hVin1 mit einem polyklonalen α -Aktin-Antikörper entwickelt, die Banden wurden densitometrisch ausgewertet (Abbildung 22, Auswertung in Tabelle 9).

Die aus Syncytien bestehenden Skelettmuskeln enthalten bezogen auf Aktin weniger Adhärenzverbindungen als die aus Einzelzellen bestehenden Herz- und Glattmuskeln. Dies zeigt sich auch in dem Verhältnis von (Meta)Vinculin zu Aktin (vgl. Auswertung in Tabelle 9). Aus diesem Grund wurden auf jeweils einem Blot lediglich *M. soleus* und *M. gastrocnemius*-Extrakte (Abbildung 22 A), bzw. Herz- und Glattmuskelextrakte (Abbildung 22 B) untereinander verglichen.

Tabelle 9: Auswertung der Quantifizierung der Metavinculin-Expression in verschiedenen Muskelgeweben der Maus nach Western-Blot Analysen (siehe Abbildung 22)

Angegeben sind für jedes der untersuchten Gewebe Vinculin-, Metavinculin-, sowie der Gesamtgehalt an (Meta)Vinculin bezogen auf Aktin (Σ Pg (Meta)Vinculin / ng Aktin) und der prozentuale Anteil der Metavinculinexpression an der Gesamtvinculinexpression (Metavinculin + Vinculin). Angaben in Picogramm (pg).

Gewebe	pg Vinculin / ng Aktin	pg Metavinculin / ng Aktin	Σ pg (Meta)Vinculin / ng Aktin	% Metavinculin
<i>M. soleus</i>	127	5,77	132,77	4,6
<i>M. gastrocnemius</i>	89	23,4	112,4	20,8
Uterus	233	122	355	34,4
Herz	345	9,2	354,2	2,6

Bezogen auf den jeweiligen Aktiningehalt zeigte sich, dass in den entsprechenden Geweben Metavinculin offensichtlich nicht zusätzlich zu Vinculin exprimiert wird, denn die jeweilige (Meta)Vinculinmenge liegt für die miteinander verglichenen Gewebe in einem ähnlichen, engen Bereich (Tabelle 9). Beispielsweise sind im Uterus, bzw. im Herzen mit ca. 355, bzw. 354 pg pro ng

Aktin beide Vinculin-Isoformen in ähnlicher Menge vorhanden, der prozentuale Anteil von Metavinculin am Gesamtvinculingehalt divergiert aber in den beiden Geweben deutlich (Tabelle 9). Da in den untereinander verglichenen Geweben der Gesamtvinculingehalt bezogen auf Aktin ähnlich, der Metavinculingehalt jedoch anteilig unterschiedlich ist, scheint Metavinculin insbesondere in Glatt- und Skelettmuskelgewebe auf Kosten Vinculins exprimiert zu werden (Tabelle 9).

3.3.3.2 Qualitative Analyse

Nach der Untersuchung der Expression Metavinculins in unterschiedlichen Muskelgeweben stellte sich die Frage, ob beide Isoformen in den entsprechenden Muskelgeweben ähnlich oder aber unterschiedlich lokalisiert sind. Die Lokalisation Metavinculins wurde zwar schon auf Gefrierschnitten humaner Muskelgewebe untersucht (Belkin et al., 1988a), jedoch nicht unter Verwendung eines „echten“ monoklonalen α -Metavinculin-Antikörpers, sondern mit einem polyklonalen α -(Meta)Vinculin-Serum, aus dem die Vinculin-erkennenden Antikörper zuvor affinitätschromatographisch eliminiert worden waren. Unter Verwendung dieses Antikörperserums konnten deutliche Metavinculin Signale im menschlichen Herzen gezeigt werden, was nicht mit der in Kapitel 3.3.3.1 dargestellten geringen Expression des Proteins in Ratten- und Mäuseherzen korreliert. Zur Klärung der subzellulären Lokalisation Metavinculins wurden von verschiedenen Muskelgeweben der Maus Gefrierschnitte angefertigt und mit verschiedenen auf ihre Spezifität überprüften (siehe Kapitel 3.3.1) monoklonalen α -Metavinculin-Antikörpern angefärbt. Bei allen in diesem Kapitel gezeigten Gefrierschnitten handelt es sich um Färbungen mit dem α -Metavinculin-Peptidantikörper 6E3 (siehe Kapitel 3.3.1).

Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen deckten sich bezüglich der Präsenz Metavinculins mit den in Kapitel 3.3.3.1 beschriebenen Ergebnissen. Mit Hilfe Metavinculin-spezifischer Antikörper konnte Metavinculin in Glattmuskel (Uterus, Blase) sowie schnellen und langsamen Skelettmuskeln nachgewiesen werden. In Herzmuskelzellen hingegen konnte Metavinculin mit keinem der verwendeten Antikörper entdeckt werden.

In Gefrierschnitten humaner Glattmuskelgewebe wurde Vinculin auf die sogenannten „dense plaques“ lokalisiert (Belkin et al., 1988a). Aufgrund ihrer Proteinkomposition lassen sich diese in die Familie der Adhärenzverbindungen eingliedern (Yamada & Geiger, 1997), zu denen auch die Fokalkontakte kultivierter Zellen zählen. Die „dense plaques“ sind mit dem Aktin-Cytoskelett verbunden und bilden rippenförmige Anordnungen entlang der Longitudinalachse der gesamten Glattmuskelzelle (Small, 1985), wie in Abbildung 23 schematisch dargestellt (entnommen aus Small & Gimona, 1998).

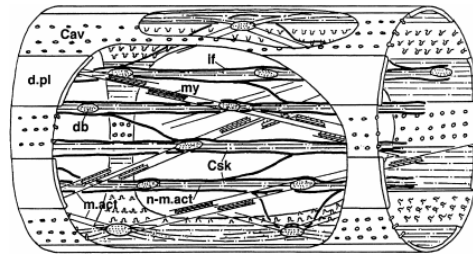


Abbildung 23: Schematische Darstellung der cytoskelettalen Struktur einer Glattmuskelzelle (entnommen aus Small & Gimona, 1998)

Die „dense plaques“ sind die Adhärenzverbindungen von Glattmuskelzellen und bilden entlang der Längsachse der Zelle an der Zellmembran rippenförmige Anordnungen. D.pl: „dense plaque“, db: „dense body“, Cav: Caveolae, Csk: Cytoskelett, If: Intermediärfilament, m.act: Muskel-Aktin, my: Myosin, n-m.act: Nicht-Muskel-Aktin

Solch eine rippenförmige Anordnung ist nach Anfärbung auch mit Metavinculin-spezifischen Antikörpern sowohl in Uterus- (nicht gezeigt) als auch in Blasenglattmuskelzellen zu sehen, in denen sie besonders deutlich ist (siehe Abbildung 24), da hier die „dense plaques“ dicker und regelmäßiger angeordnet sind.

Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Anfärbung von Blasenmuskelzellen mit dem Antikörper hVin1 (Sigma), dessen Epitop im Vinculin-Kopf liegt und der daher beide Isoformen erkennt. Da auch Metavinculin angefärbt wird, ist es schwierig, allein daraus eine Kolokalisation beider Vinculin-Isoformen abzuleiten. Vinculin wird jedoch in muriner Glattmuskulatur stärker exprimiert als Metavinculin (siehe Kapitel 3.3.3.1). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass sich die beobachtete Anfärbung der „dense plaques“ zum guten Teil auf Vinculin zurückführen lässt. Transfektions- und Mikroinjektionsexperimente konnten eine Kolokalisation beider Isoformen in Adhärenzverbindungen bereits nachweisen (Kapitel 3.3.2, bzw. Saga et al., 1985).

Da muskuläre Adhärenzverbindungen in immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen oftmals unspezifische Färbungen aufweisen, wurden Kontrollen ohne Erstantikörper (Abbildung 24 F) und nach Präinkubation des Metavinculin-spezifischen Antikörpers 6E3 mit einem Metavinculin-Einschub-Peptid (Abbildung 24 E, siehe auch Kapitel 3.3.1) angefertigt. Das Fehlen eines deutlichen Signals in beiden Kontrollen spricht für die Spezifität der Metavinculin-Färbung.

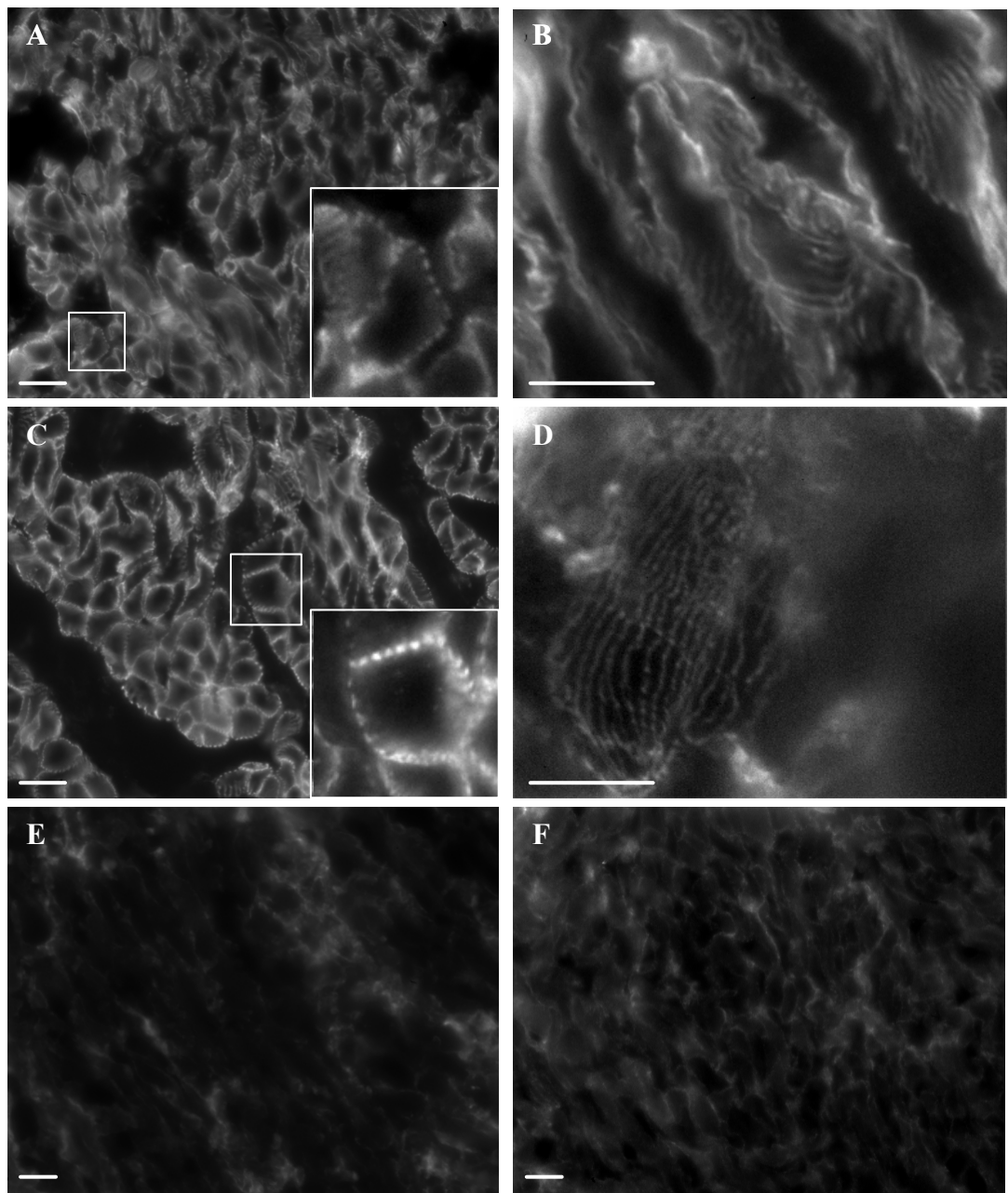


Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von (Meta)Vinculin in Glattmuskulaturgewebe

Gefrierschnitte von Blasengewebe der Maus (transversal A, C, E, F / longitudinal B, D), gefärbt mit dem Metavinculin-spezifischen Antikörper 6E3 (C, D), bzw. dem α -(Meta)Vinculin-Kopf-Antikörper hVin1 (A, B). E: Metavinculin-spezifischer Antikörper 6E3 präinkubiert mit entsprechendem Metavinculin-Peptid, F: Nur Zweitantikörper (α -Maus-Alexa Fluor 568, 1:600). Beide Antikörper zeigen eine deutliche Anfärbung der rippenförmigen „dense plaques“ glatter Muskulatur, die in den Kontrollen fehlt. Balken: 10 μ M.

Die Präsenz einer Metavinculin-Bande in Western-Blots von Skelettmuskel-Gewebeextrakten (siehe Kapitel 3.3.3.1) spiegelt sich auch auf Gefrierschnitten wieder (Abbildung 25): In schnellen wie in langsamen Skelettmuskeln ist bei Anfärbung mit Metavinculin-spezifischen Antikörpern eine deutliche Querstreifung erkennbar (Abbildung 25 A). Da Metavinculin bekanntermaßen mit Adhäsionsstrukturen assoziiert ist, handelt es sich hier mit hoher Wahrscheinlichkeit um Costamere, die Verknüpfungspunkte der Z-Scheiben mit der Zellmembran. Verglichen mit Glattmuskelschnitten fällt auf Skelettmuskelschnitten die Metavinculin-Färbung deutlich schwächer aus, was mit der im Western-Blot beobachteten schwächeren Expression des Proteins im Skelettmuskel korreliert.

Auch bei Skelettmuskelgefrierschnitten kann die Spezifität der Metavinculin-Färbung durch Vergleich mit einer Kontrolle ohne Erstantikörper bewiesen werden (Abbildung 25 C). Dass in beiden Präparaten tatsächlich vergleichbare quergestreifte Bereiche untersucht wurden, beweisen die zur Kontrolle angefertigten Phasenkontrastaufnahmen (Abbildung 25 B, D). Die Spezifität der Anfärbung konnte auch für Skelettmuskelschnitte gezeigt werden, da nach Präinkubation des α -MVI-Antikörpers 6E3 mit einem entsprechenden MVI-Peptid ebenfalls keine Anfärbung mehr zu sehen war (vgl. Abbildung 24 E für Glattmuskel).

Obwohl der Metavinculin-Anteil am (Meta)Vinculingehalt im langsamen Skelettmuskel *M.soleus* auf ca. 5 % ermittelt wurde (siehe Kapitel 3.3.3.1), ist auch in *M.soleus*-Gefrierschnitten eine deutliche Querstreifung erkennbar, teilweise sogar deutlicher als in *M.gastrocnemius*-Gefrierschnitten (nicht gezeigt). Möglicherweise ist dies auf einen höheren cytoplasmatischen Anteil Metavinculins in schnellen Skelettmuskeln zurückzuführen, dessen Anfärbung in Gefrierschnitten die mit Adhärenzverbindungen assoziierte Form verdecken könnte.

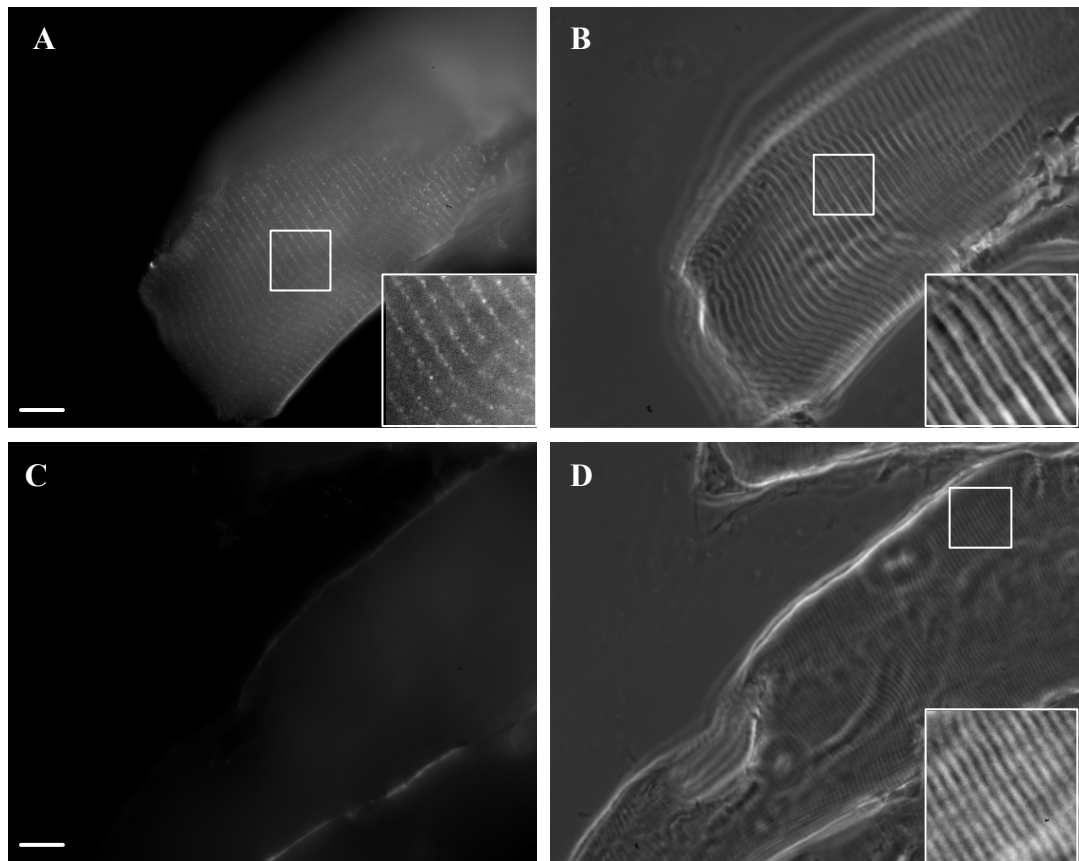


Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Lokalisation von (Meta)Vinculin in schneller Skelettmuskulatur

Gefrierschnitte (M.gastrocnemius), gefärbt mit dem Metavinculin-spezifischen Antikörper 6E3 (A), bzw. zur Kontrolle ohne Erst-Antikörper (C). B und D zeigen die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen, in denen die sarkomere Querstreifung sichtbar ist. Zweitantikörper α -Maus-Alexa Fluor 568, 1:600. Balken: 10 μ M.

Auch in Gefrierschnitten muriner Herzen wurde die Lokalisation von (Meta)Vinculin untersucht (siehe Abbildung 26). Bei Verwendung des Vinculin-Kopf-spezifischen Antikörpers hVin1 werden spezifisch die Glanzstreifen zwischen benachbarten Zellen wie auch die Costamere der einzelnen Cardiomyocyten angefärbt (Abbildung 26 A). Sowohl die Querstreifung des kontraktilen Apparates der Cardiomyocyten sowie die Glanzstreifen, durch die Herzmuskelzellen miteinander an ihren Enden verknüpft sind, sind bereits in Phasenkontrastaufnahmen erkennbar (Abbildung 26 B). Anders als bei Verwendung des hVin1-Antikörpers konnten mit keinem der verwendeten Metavinculin-spezifischen Antikörper adhäsive Strukturen der Cardiomyocyten angefärbt werden (exemplarisch mit α -MVI-Peptidantikörper 6E3 in Abbildung 26 C). Dass es sich bei den untersuchten Zellen um Cardiomyocyten handelte, beweist die zur Kontrolle angefertigte Phasenkontrastaufnahme, in der die Querstreifung der Zellen deutlich erkennbar ist (Abbildung 26 D).

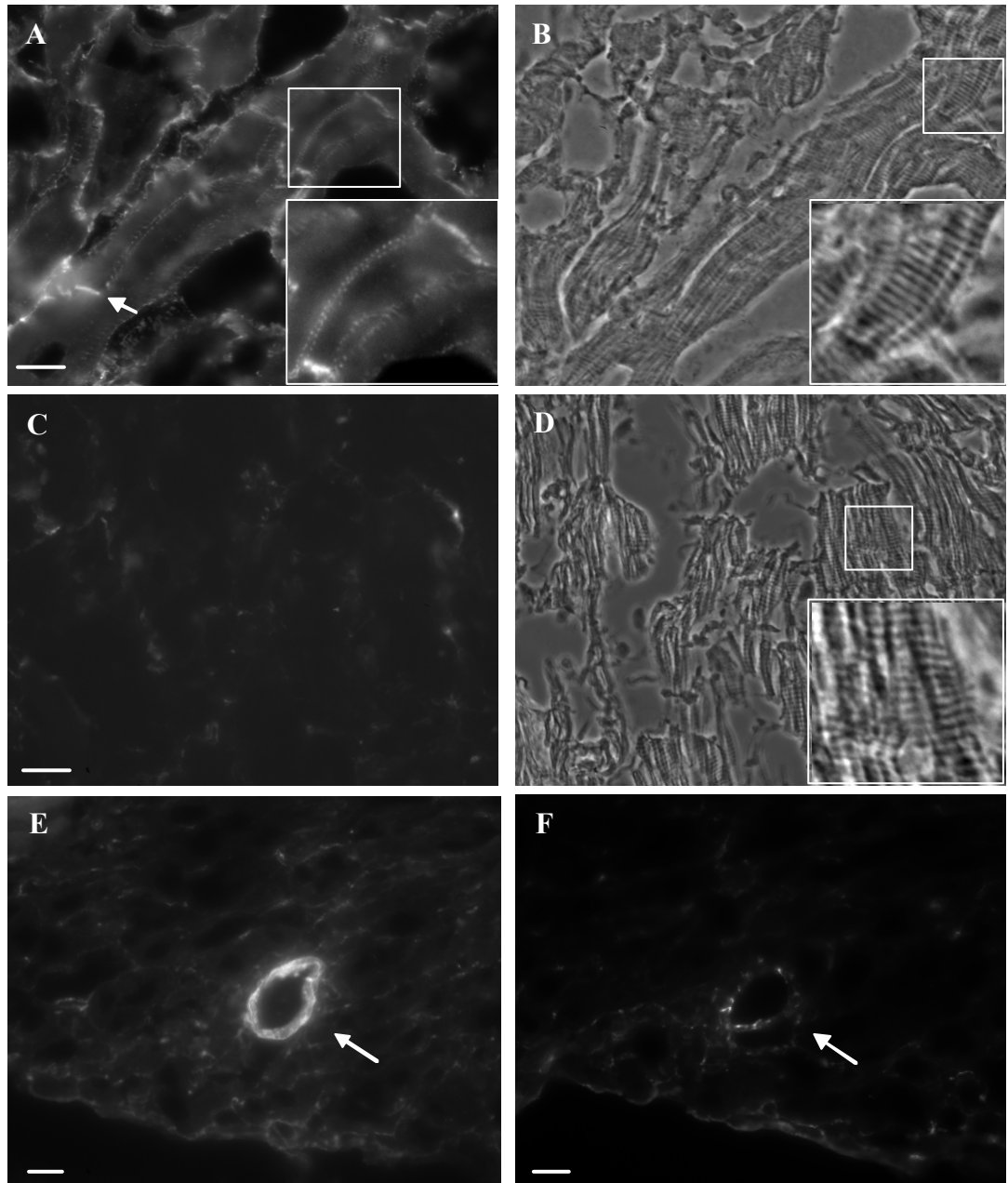


Abbildung 26: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Lokalisation von (Meta)Vinculin im Herzen

Gefrierschnitte, gefärbt mit dem Kopf-spezifischen α -(Meta)Vinculinantikörper hVin1 (A) sowie dem Metavinculin-spezifischen Antikörper 6E3 (C). B) und D) zeigen die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen, in denen die Querstreifung der Herzmuskulatur sichtbar ist. E) zeigt die Anfärbung eines Blutgefäßes (Pfeil) innerhalb des Herzens mit dem Metavinculin-spezifischen Antikörper 6E3, in F) ist die entsprechende Kontrolle ohne Erstantikörper desselben Bereichs dargestellt (Serienschnitt). Zweitantikörper: α -Maus-Alexa Fluor 568, 1:600. Balken: 10 μ M.

Das Fehlen spezifischer Metavinculin-Signale in Cardiomyocyten korreliert mit der im Western-Blot sowie über RT-PCR ermittelten überraschend niedrigen Expressionsrate des Proteins im Herzen. Möglich ist, dass in Herzmuskelzellen die Epitope für die verwendeten Metavinculin-spezifischen Antikörper schlechter zugänglich sind als in den anderen Muskelzelltypen, dagegen spricht jedoch, dass sowohl im Western-Blot, als auch auf mRNA-Ebene nur sehr wenig Metavinculin in Herzen von Mäusen und Ratten nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu den in Herzmuskelzellen fehlenden Signalen bei Anfärbung mit Metavinculin-spezifischen Antikörpern steht die gute Anfärbbarkeit von glatter Gefäßmuskulatur kleiner Blutgefäße innerhalb des Herzens (siehe Abbildung 26 E). Die Möglichkeit, dass es sich bei diesen Signalen um unspezifische Färbung aufgrund einer hohen räumlichen Konzentration von Immunglobulinen aus dem Blut handelt, konnte mittels einer Kontrolle ohne Verwendung des ersten Antikörpers ausgeschlossen werden (Abbildung 26 F).

Darüber hinaus ließen im Herzen wie auch in allen anderen untersuchten Geweben die hier als Metavinculin-spezifisch beschriebenen Signale durch ein im 1000-fachen molaren Überschuss eingesetztes zum entsprechenden Antikörper passendes Metavinculin-Peptid deutlich reduzieren (nicht gezeigt). Dies spricht eindeutig für deren Spezifität.

3.4 Vergleichende biochemische Charakterisierung

Viele der im Folgenden vorgestellten biochemischen Experimente wurden mit bakteriell exprimierten Schwanzdomänen von Vinculin und Metavinculin durchgeführt (Kapitel 3.4.1). Die klare Domänenstruktur von Vinculin und Metavinculin, deren einziger Unterschied sich in der Schwanzdomäne befindet, legitimiert dieses Vorgehen, zumal sich die Schwanzdomänen aufgrund ihrer geringen Größe leicht durch bakterielle Expression herstellen lassen. Streng genommen sind es jedoch die Gesamtproteine, deren biochemische Eigenschaften sich in zellulärem Kontext auswirken. Aus diesem Grund sollten auch die Gesamtproteine aus der vergleichenden biochemischen Charakterisierung nicht völlig ausgeschlossen werden (Kapitel 3.4.2).

3.4.1 Vergleichende Analysen der isolierten Schwanzdomänen von Vinculin und Metavinculin

Durch seine zentrale Bedeutung für zelluläre Adhäsionsprozesse war und ist Vinculin Gegenstand vieler Untersuchungen. Daher existieren eine Reihe anerkannter Analysemethoden, die bisher jedoch fast ausschließlich mit Vinculin, bzw. der Vinculin-Schwanzdomäne durchgeführt wurden. Für die biochemische Charakterisierung von Vinculin und Metavinculin wurden diese Experimente in der vorliegenden Arbeit mit den Schwanzdomänen beider Proteine im direkten Vergleich durchgeführt. Die Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.4.1.1 Interaktion mit F-Aktin

3.4.1.1.1 Filamente

Mit Hilfe TRITC-markierten Phalloidins können auch *in vitro* Aktinfilamente und ihre Organisation fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden. Dies machten sich bereits Rüdiger et al. in unserer AG zunutze, um die Organisation von Aktinfilamenten zu höheren Strukturen durch die Metavinculin, bzw. Vinculin-Schwanzdomäne zu dokumentieren (Rüdiger et al., 1998). Wie in dieser Studie beschrieben, führt die Inkubation der Vinculin-Schwanzdomäne mit Aktinfilamenten zur Bildung dicker, annähernd gerader Aktin-Bündel. Wurde hingegen die Metavinculin-Schwanzdomäne mit Aktinfilamenten inkubiert, so kam es zur Ausbildung flexibler, filigraner Aktin-Netzwerke.

Da die differentielle Organisation von Aktinfilamenten den ersten Hinweis auf einen modulativen Einfluss des Metavinculin-Einschubs auf Aktin-Suprastrukturen lieferte, sollte dieses Experiment für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine nachvollzogen werden. Wie in Abbildung 27 gezeigt, bewirkt die Inkubation der Metavinculin-Schwanzdomäne mit Aktinfilamenten die Ausbildung von netzwerkartig organisierten Aktinfilamentbündeln. Die Vinculin-Schwanzdomäne

induziert die Bildung von dicken, kaum vernetzten Aktin-Bündeln. Im Vergleich mit den durch die Metavinculin-Schwanzdomäne induzierten Strukturen sind die Bündel kürzer und wirken steifer.

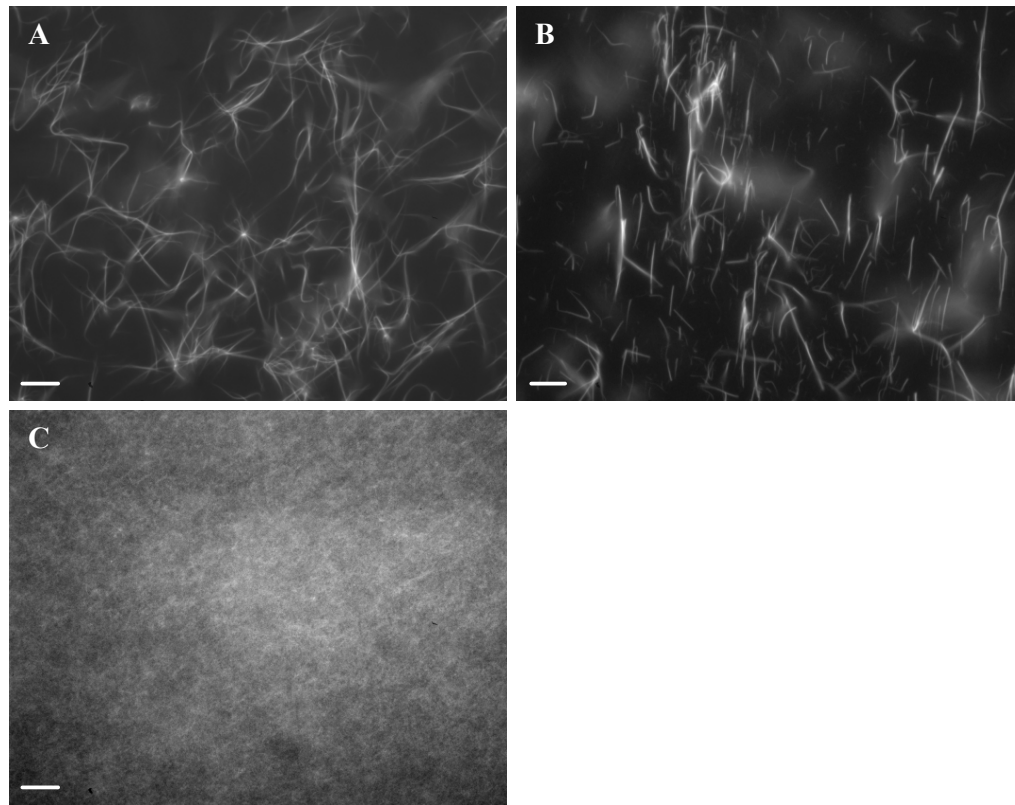


Abbildung 27: *In vitro*-Analyse der Aktinfilamentorganisation durch die Vinculin-, bzw. Metavinculin-Schwanzdomäne

Die Metavinculin-Schwanzdomäne (A) führt zur Ausbildung von filamentösen Aktin-Netzwerken, die Vinculin-Schwanzdomäne (B) bewirkt die Bildung von kürzeren, spröder erscheinenden Aktin-Bündeln. C) zeigt die Aktinkontrolle. Balken: 10 μ M

3.4.1.1.2 Metavinculin-Schwanz und Vinculin-Schwanz zeigen ein ähnliches Bindungsverhalten für F-Aktin

Ausgehend von der im Filamentassay (siehe Kapitel 3.4.1.1.1) beobachteten differentiellen Organisation von Aktinfilamenten sollte untersucht werden, inwieweit sich die relative Affinität der Vinculin- und der Metavinculin-Schwanzdomäne für Aktinfilamente unterscheidet. Beispielsweise wäre denkbar, dass die saure Ladung des Metavinculin-Einschubs zu einer geringeren Affinität der Metavinculin-Schwanzdomäne gegenüber den sauren Aktinfilamenten führt. Zu diesem Zweck wurden mit den Proteinen VT₈₅₈₋₁₀₆₆ und MVT₈₅₈₋₁₀₆₆ vergleichend „high-speed“ F-Aktin-Kosedimentationen durchgeführt, in denen präpolymerisiertes Aktin mit beiden rekombinanten Proteinen inkubiert und anschließend bei 100000 g abzentrifugiert wurde (siehe Kapitel 2.2.2.10.1). In

SDS-PAGE-Analysen wurde untersucht, wie viel Protein sich jeweils im Pellet und Überstand befand (siehe Abbildung 28).

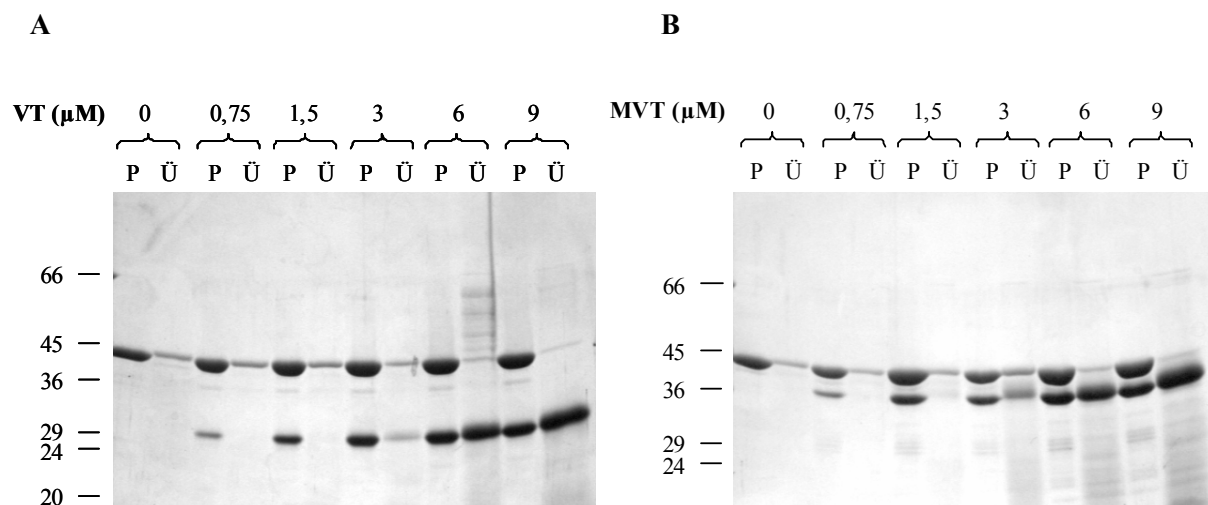


Abbildung 28: Analyse der Interaktion der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne mit F-Aktin in Kosedimentationen

Repräsentative Coomassie-gefärbte SDS-Gele einer Kosedimentationsanalyse. A) Vinculin-Schwanzdomäne, B) Metavinculin-Schwanzdomäne. Beide rekombinanten Schwanzdomänen kosedimentieren in ähnlicher Weise mit F-Aktin. Die Sättigungscharakteristik für die Bindung an Aktinfilamente ist bei beiden Proteinen ähnlich, bei einem 3-fachen molaren Überschuss der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne gegenüber Aktin befindet sich bereits viel Protein im Überstand. F-Aktin 3 µM, P: Pellet, Ü: Überstand

Die SDS-Gele beider Proteine ähnelten einander stark, auch in der densitometrischen Auswertung konnten kaum Unterschiede festgestellt werden (siehe Abbildung 29).

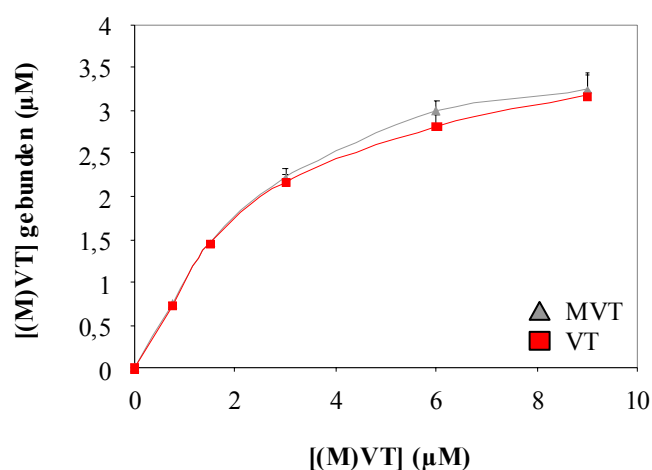


Abbildung 29: Bindungskurven für die Interaktion der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne mit F-Aktin

Densitometrische Auswertung von F-Aktin-Kosedimentationsanalysen aus 5 unabhängigen Versuchen (siehe Abbildung 28). Die Bindungskurven der rekombinanten (Meta)Vinculin-Schwanzdomänen für die Bindung an F-Aktin ähneln einander stark. Im hinteren Teil der Graphen auftretende Abweichungen liegen im Bereich der Fehlertoleranz.

In F-Aktin-Kosedimentationen ist das Bindungsverhalten beider Proteine gegenüber Aktinfilamenten nahezu identisch. Beide Proteine binden offenbar in ähnlicher Weise an F-Aktin und folgen einer ähnlichen Sättigungscharakteristik (siehe Abbildung 28), denn bei einem identischen Überschuss der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne gegenüber F-Aktin befindet sich ein vergleichbarer Anteil beider Proteine im Überstand (Abbildung 29). Divergenzen im hinteren Teil beider Graphen liegen innerhalb der Fehlertoleranz und sind nicht signifikant. Die differentielle Organisation von Aktinfilamenten zu Suprastrukturen ist daher wahrscheinlich nicht auf eine unterschiedliche Affinität beider Proteine gegenüber F-Aktin zurückzuführen.

3.4.1.1.3 Bei Inkubation mit F-Aktin dimerisiert Metavinculin-Schwanz schlechter als das entsprechende Vinculin-Schwanz- Konstrukt

Wie von Johnson & Craig 2000 mittels „chemical crosslinking“-Versuchen beschrieben, ist für die Vinculin-Schwanzdomäne die Bildung von Dimeren durch Inkubation mit F-Aktin induzierbar (siehe Kapitel 1.1.5). Dieses Verhalten der Vinculin-Schwanzdomäne konnte mit dem in dieser Arbeit verwendeten Protein wie dort beschrieben reproduziert werden (Abbildung 30 A, B).

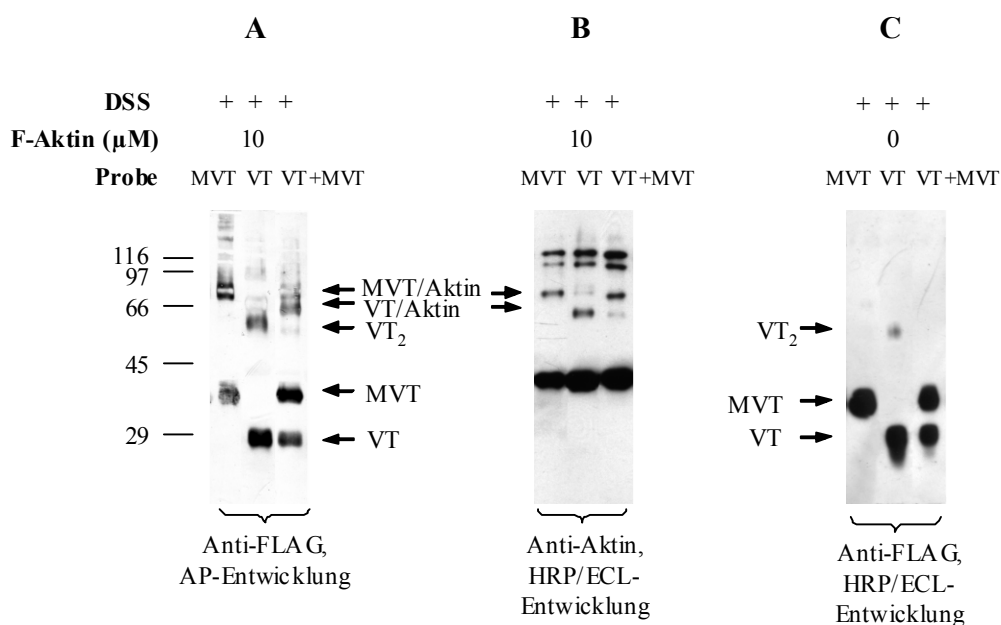


Abbildung 30: Untersuchung des F-Aktin-induzierten Oligomerisierungsverhaltens der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne (AS 858-1066)

„Crosslink“ mit MVT₈₅₈₋₁₀₆₆, VT₈₅₈₋₁₀₆₆ sowie einem Gemisch beider Proteine nach Inkubation mit F-Aktin. Entwicklung des Blots α -FLAG / AP (A) nach vorheriger Entwicklung gegen Aktin / HRP-ECL (B). Die Vinculin-Schwanzdomäne bindet an F-Aktin und bildet Homodimere. Die Metavinculin-Schwanzdomäne bindet auch an F-Aktin, eine eindeutige Aussage bezüglich der Dimerisierung ist jedoch nicht möglich, da die Banden aufgrund eines ähnlichen Laufverhaltens von MVT und Aktin im SDS-Gel schwer zuzuordnen sind. C) Kontrolle ohne Aktin mit „crosslinker“. VT₂: VT-Dimer. „Crosslinker“: DSS.

Bei Inkubation mit F-Aktin kommt es bei der Vinculin-Schwanzdomäne zur Bildung von Vinculin-Schwanz/Aktin- Heterodimeren, Vinculin-Schwanz-Homodimeren und höheren Oligomeren, bei denen es sich zumeist um höhere Vinculin/Aktin-Oligomere sowie Aktin-Oligomere handelt. Die Dimerisierung der Vinculin-Schwanzdomäne lässt sich am besten bei einem molaren Verhältnis von 1-2:1 (Aktin : Vinculin-Schwanz) induzieren. Daher ist zur Vereinfachung in den Abbildungen 30 und 31 jeweils nur dieser Ansatz gezeigt. Die Ergebnisse für verschiedene Konzentrationen Aktins finden sich im Anhang. Das Ergebnis für die Metavinculin-Schwanzdomäne ist weniger eindeutig, da sich aufgrund eines ähnlichen Molekulargewichtes MVT₈₅₈₋₁₀₆₆ / Aktin-Heterodimere und MVT₈₅₈₋₁₀₆₆-Homodimere im SDS-Gel nicht eindeutig voneinander trennen lassen. Auch die Entwicklung im Western-Blot liefert kein klares Ergebnis, da die Bande sowohl mit einem α -Aktin-, als auch mit einem α -FLAG-Antikörper (siehe Kapitel 2.1.6) nachweisbar ist (Abbildung 30). Eine deutliche Metavinculin-Schwanz-Homodimer-Bande auf anderer Höhe, die nur mit einem α -FLAG-Antikörper nachweisbar ist, ist nicht vorhanden. Daher kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass es sich bei der betreffenden Bande um eine Doppelbande aus Metavinculin-Schwanz/Aktin-Heterodimeren und Metavinculin-Schwanz-Homodimeren handelt.

Zur eindeutigen Klärung des Problems wurden kleinere rekombinante Proteine ((M)VT₈₇₉₋₁₀₆₆) sowie größere MBP-Fusionsproteine (AS 858-1066, siehe Kapitel 3.1) aufgereinigt. Mit diesen Proteinen, deren Bande sich im SDS-Gel besser von Aktin unterscheiden lässt, wurde der Versuch wiederholt (für (M)VT₈₇₉₋₁₀₆₆ siehe Abbildung 31, für MBP-(M)VT Daten nicht gezeigt).

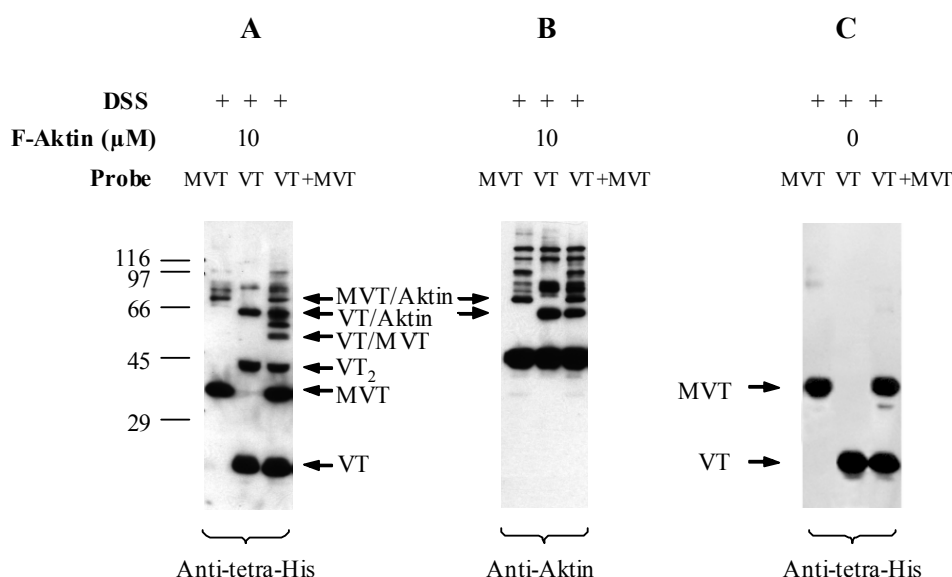


Abbildung 31: Untersuchung des F-Aktin-induzierten Oligomerisierungsverhaltens der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne ((M)VT₈₇₉₋₁₀₆₆)

„Crosslink“ mit MVT₈₇₉₋₁₀₆₆, VT₈₇₉₋₁₀₆₆ sowie einem Gemisch beider Proteine nach Inkubation mit F-Aktin. Entwicklung der Blots α -tetra-His (A) und α -Aktin (B). Die Vinculin-Schwanzdomäne bindet an F-Aktin und bildet Homodimere. Die Metavinculin-Schwanzdomäne bindet auch an Aktin, bildet aber schlechter Homodimere, es gibt aber VT/MVT-Heterodimere. C) Kontrolle ohne Aktin mit „crosslinker“. VT₂: VT-Dimer. „Crosslinker“: DSS.

In beiden Fällen verhält sich die Vinculin-Schwanzdomäne wie das oben schon beschriebene Protein. Bei der Metavinculin-Schwanzdomäne hingegen sind gegenüber der Vinculin-Schwanzdomäne deutliche Unterschiede zu verzeichnen: Während bei der Vinculin-Schwanzdomäne bei Inkubation mit F-Aktin Vinculin-Schwanz-Homodimere induzierbar sind, treten diese bei der Metavinculin-Schwanzdomäne nicht auf. Metavinculin-Schwanz/Aktin-Heterodimere hingegen sind in ähnlicher Weise bei beiden Proteinen nachweisbar. Darüber hinaus ist insbesondere im Falle der (M)VT₈₇₉₋₁₀₆₆-Proteine das Auftreten einer deutlichen VT/MVT-Heterodimerbande zu verzeichnen (siehe auch Kapitel 3.4.1.3).

Wurden die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen MVT-Ladungsmutanten in einem „crosslink“ mit F-Aktin verwendet, so konnte im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp-MVT-Konstrukt eine deutlich verbesserte Dimerisierung beobachtet werden (nicht gezeigt), was möglicherweise für einen Einfluss der negativen Ladung des Metavinculin-Einschubs auf die Bildung von MVT-Homodimeren spricht (siehe Kapitel 4.2.3.1).

3.4.1.2 Interaktion mit sauren Phospholipiden

3.4.1.2.1 Bei Inkubation mit PIP₂ oligomerisiert Metavinculin-Schwanz schlechter als das entsprechende Vinculin-Schwanz-Konstrukt.

Bei der Vinculin-Schwanzdomäne kann die Bildung von Dimeren und höheren Oligomeren auch durch Inkubation mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) induziert werden (Hüttelmaier et al., 1998).

Um das PIP₂-induzierte Oligomerisierungsverhalten der Metavinculin-Schwanzdomäne mit der Vinculin-Schwanzdomäne zu vergleichen, wurden wie in jener Arbeit beschrieben „chemical crosslinking“-Experimente der rekombinant aufgereinigten Schwanzdomänen in Gegenwart steigender Konzentrationen von PIP₂ durchgeführt. Die Proben wurden im Western-Blot mit dem α -FLAG-Antikörper analysiert (Abbildung 32).

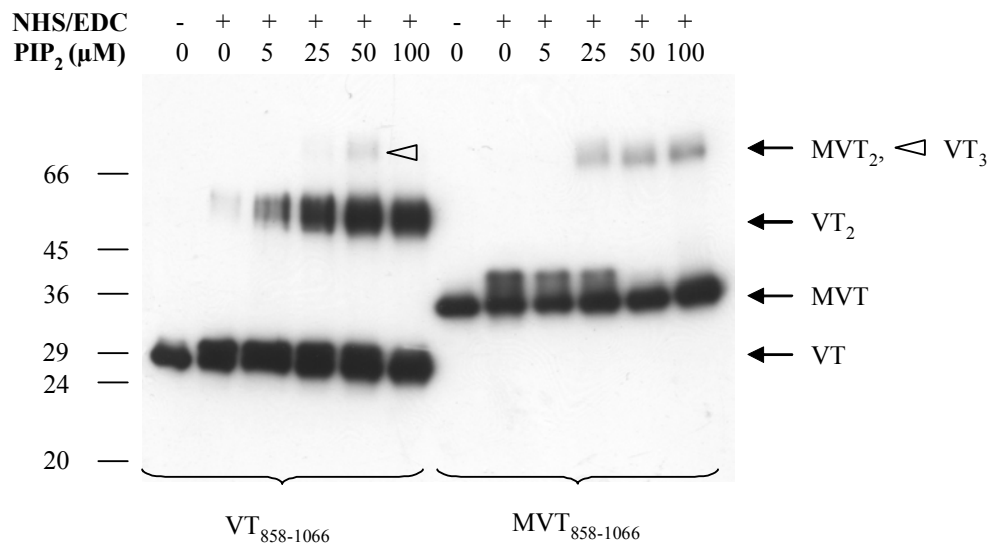


Abbildung 32: Der Effekt saurer Phospholipide auf die Oligomerisierung der Vinculin-, bzw. Metavinculin-Schwanzdomäne

„Crosslink“ mit der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne bei vorheriger Inkubation mit PIP₂, Western-Blot α -FLAG, „Crosslinker“: EDC/NHS. Die Vinculin-Schwanzdomäne oligomerisiert bei Inkubation mit sauren Phospholipiden besser als die Metavinculin-Schwanzdomäne, Es gibt keine höheren MVT-Oligomere. MVT /VT 5 μ M; VT₂: VT-Dimer, VT₃: VT-Trimer, MVT₂: MVT-Dimer

Bei einem molaren Überschuss von 2:1 gegenüber der Vinculin-Schwanzdomäne konnte durch PIP₂-Inkubation auch die Bildung höherer Vinculin-Schwanz-Oligomere erzielt werden.

Im Gegensatz dazu bewirkten bei der Metavinculin-Schwanzdomäne gleiche Mengen PIP₂ eine schwächere Dimerisierung als bei der Vinculin-Schwanzdomäne. Auch höhere PIP₂-Konzentrationen bewirkten keine Verstärkung der Dimerisierung. Höhere MVT-Oligomere waren in keinem Fall zu beobachten.

MVT-Proteine, in denen der saure Charakter des Metavinculin-Einschubs durch Einbringen polarer neutraler Aminosäuren abgeschwächt wurde (Abbildung 14), zeigten auch im „crosslink“ mit PIP₂ hingegen wieder eine durch saure Phospholipide induzierbare deutlich verbesserte Dimerisierung (Abbildung 33). Des Weiteren waren in diesem Versuch bei beiden Mutanten im Gegensatz zum Wildtypprotein höhere Metavinculin-Oligomere zu beobachten. Diese Versuche deuten in Kombination mit den unter Kapitel 3.4.1.1.3 beschriebenen Daten darauf hin, dass die negative Ladung des Metavinculin-Einschubs einen inhibitorischen Einfluss auf die Dimerisierung des Proteins ausübt.

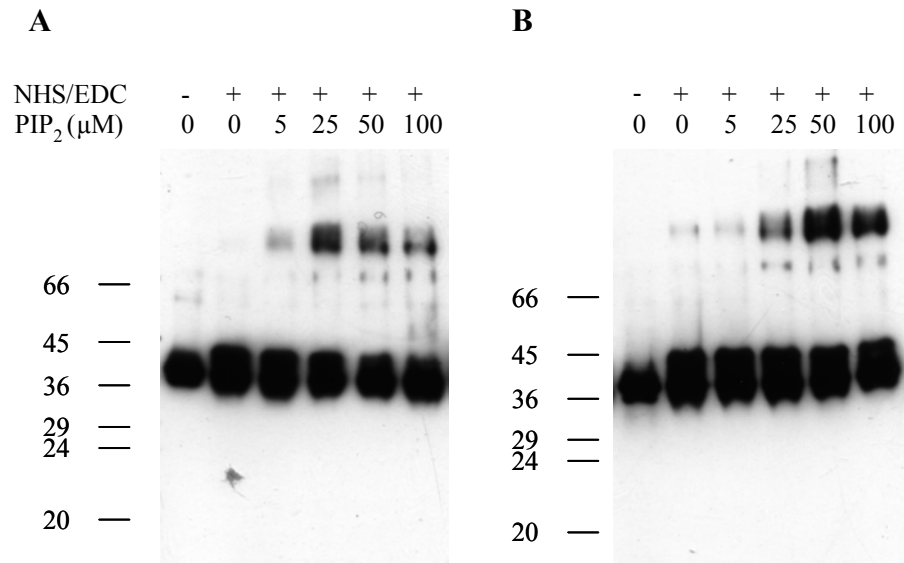


Abbildung 33: Der Effekt saurer Phospholipide auf die Oligomerisierung mutierter Metavinculin-Schwanzdomänen

„Crosslink“ mit Metavinculin-Schwanzproteinen, in denen die saure Ladung des Metavinculin-Einschubs durch Austausch saurer gegen neutrale Aminosäuren neutralisiert wurde (siehe Kapitel 3.1.1) bei vorheriger Inkubation mit PIP₂, Western-Blot α-FLAG. Die MVT-Ladungsmutanten bilden bei Inkubation mit PIP₂ besser Di- und Oligomere als das Wildtypprotein. MVT-NNQ₈₅₈₋₁₀₆₆ / MVT-QNQ₈₅₈₋₁₀₆₆: 5 μM, „Crosslinker“: EDC/NHS.

3.4.1.2.2 Metavinculin-Schwanz bindet schlechter an saure Phospholipide als das entsprechende Vinculin-Schwanz-Konstrukt

Um herauszufinden, ob das unterschiedliche PIP₂-induzierte Dimerisierungsverhalten der Vinculin- und der Metavinculin-Schwanzdomäne auf eine geringere Affinität der Metavinculin-Schwanzdomäne gegenüber sauren Phospholipiden rückführbar ist, wurden „Pulldownassays“ mit Saccharose-gefüllten Lipidvesikeln durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.2.14). Zu diesem Zweck wurden Saccharose-gefüllte Lipidvesikel hergestellt, deren Zusammensetzung variiert wurde: Um die Lipidzusammensetzung der Zellmembran nachzuahmen, wurden die Phospholipide Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und PIP₂ in einem Verhältnis von 6:3:1 eingesetzt. Darüber hinaus wurden noch weitere Kombinationen mit höherem Anteil saurer Phospholipide (4,5:4,5:1) und ohne saure Phospholipide getestet. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abbildung 34 dargestellt.

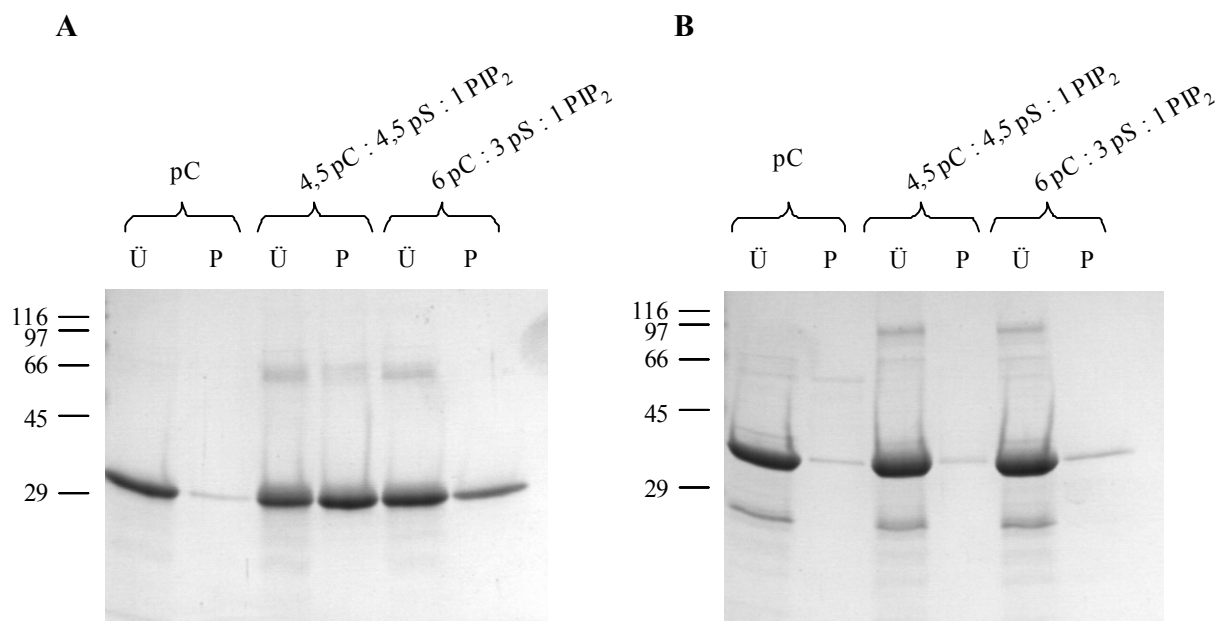


Abbildung 34: Charakterisierung der Affinität der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne gegenüber Phospholipiden im Saccharose-Lipidvesikel-Pulldown

Die Vinculin-Schwanzdomäne (A) bindet besser an saure Phospholipide als die Metavinculin-Schwanzdomäne (B). Beide Proteine binden nicht an neutrale Phospholipide. pC: Phosphatidylcholin, pS: Phosphatidylserin, PIP_2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, P: Pellet, Ü: Überstand

Das Vinculin-Schwanzprotein (Abbildung 34 A) sedimentierte nur mit Saccharose-gefüllten Lipidvesikeln, die saure Phospholipide enthielten. Es zeigte sich, dass der Anteil saurer Phospholipide in den Lipidvesikeln für die Bindung der Vinculin-Schwanzdomäne kritisch ist, denn bei den Saccharose-gefüllten Lipidvesikeln mit höherem Anteil saurer Phospholipide (4,5:4,5:1) befand sich mehr Protein im Pellet. Enthielten die Lipidvesikel keine sauren Phospholipide, konnte keine Bindung der Vinculin-Schwanzdomäne festgestellt werden und das Protein verblieb im Überstand.

Das Metavinculin-Schwanzprotein (Abbildung 34 B) sedimentierte mit keinem der drei Lipidvesikel und blieb in jedem Fall im Überstand. Vermutlich bindet das Metavinculin-Schwanzprotein schwächer an saure Phospholipide als das entsprechende Vinculin-Schwanzprotein.

Die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen MVT-Ladungsmutanten sollten im Saccharose-Lipidvesikel-Pulldown untersucht und bezüglich ihrer Affinität für saure Phospholipide mit der Metavinculin-Schwanzdomäne verglichen werden. Leider traten im Laufe der Arbeit methodische Probleme auf, die sich nur durch eine Modifikation der verwendeten Salzkonzentration beheben ließen. Dies führte dazu, dass die in Abbildung 35 graphisch dargestellte densitometrische Auswertung für die Wildtypproteine nicht exakt mit den oben dargestellten SDS-Gelen zusammenpasst. Dennoch ist auch hier deutlich sichtbar, dass die Metavinculin-Schwanzdomäne mit deutlich schwächerer Affinität an saure Phospholipide bindet als die Vinculin-Schwanzdomäne. Die Mutanten nehmen bezüglich ihrer Affinität für saure Phospholipide eine intermediäre Position zwischen der Metavinculin- und der

Vinculin-Schwanzdomäne ein. Sie verfügen gegenüber dem Wildtypprotein über eine deutlich verbesserte Bindung an saure Phospholipide.

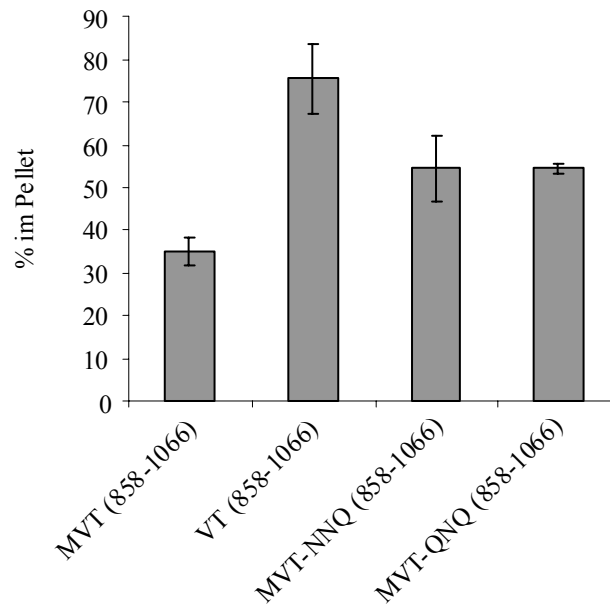


Abbildung 35: Densitometrische Auswertung eines Saccharose-Lipidvesikel-Pulldowns mit der Metavinculin-Schwanzdomäne, der Vinculin-Schwanzdomäne sowie zwei Ladungsmutanten der Metavinculin-Schwanzdomäne

Gezeigt ist der prozentuale Anteil der eingesetzten Proteine, der mit sauren Saccharose-gefüllten Lipidvesikeln pelletiert. Verwendet wurde ein Lipidgemisch mit dem Verhältnis 4,5 Phosphatidylcholin : 4,5 Phosphatidylserin : 1 PIP₂. Eine Abschwächung der negativen Ladung des Metavinculin-Einschubs bewirkt eine gegenüber dem Wildtypprotein verbesserte Bindung an saure Phospholipide. MVT-NNQ, -QNT Metavinculin-Schwanz-Ladungsmutanten, siehe Kapitel 3.1.1

3.4.1.2.3 Die Bindung an F-Aktin lässt sich bei Metavinculin-Schwanz und Vinculin-Schwanz in ähnlicher Weise durch Inkubation mit sauren Phospholipiden verdrängen

Da die Metavinculin-Schwanzdomäne im Saccharose-Lipidvesikel-Pulldown eine schwächere Bindung an saure Phospholipide aufwies, sollte getestet werden, inwieweit sich die Bindung an Aktinfilamente durch saure Phospholipide verdrängen lässt. Zu diesem Zweck wurden „high-speed“-Kosedimentationen in Anwesenheit steigender Mengen PIP₂ durchgeführt. Als Vergleich diente wiederum die Vinculin-Schwanzdomäne, für die die kompetitive Inhibition bereits gezeigt wurde (Steimle et al., 1999).

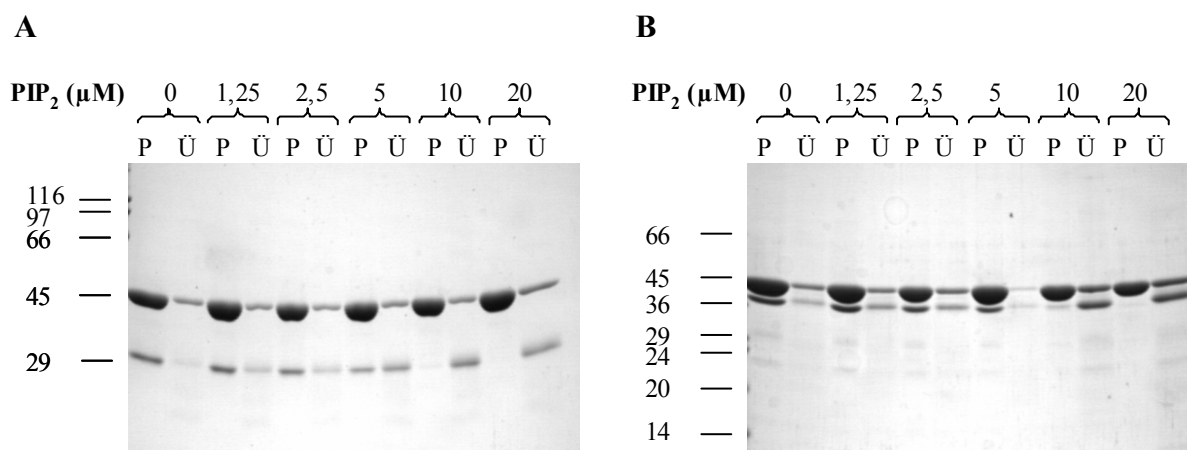


Abbildung 36: Vergleichende Analyse der Konkurrenz von PIP_2 mit F-Aktin um die Bindung an die (Meta)Vinculin Schwanzdomäne

„High speed“-Kosedimentationen mit steigenden Mengen PIP_2 . Ein identischer Überschuss an PIP_2 verdrängt in ähnlicher Weise die Aktinbindung der Vinculin-Schwanzdomäne (A) und der Metavinculin-Schwanzdomäne (B). F-Aktin 3 μM , (M)VT 2 μM , P: Pellet, Ü: Überstand

Bei beiden Proteinen ließ sich die Bindung an F-Aktin durch PIP_2 in ähnlicher Weise verdrängen (siehe Abbildung 36): In Gegenwart steigender Mengen von PIP_2 befand sich die Vinculin-Schwanzdomäne (Abbildung 36 A) wie auch die Metavinculin-Schwanzdomäne (Abbildung 36 B) zunehmend im Überstand, was eine kompetitive Hemmung der F-Aktin-Bindung für beide Proteine bestätigt. Bei einem rund 3-fachen molaren Überschuss saurer Phospholipide gegenüber F-Aktin verblieben beide Schwanzdomänen nahezu vollständig im Überstand.

Die Konkurrenz saurer Phospholipide mit F-Aktin ist vermutlich durch das Überlappen von Aktin- und Phospholipid-bindenden Regionen innerhalb der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne (siehe Kapitel 1.1.5) bedingt. Diese Ergebnisse widersprechen scheinbar den zuvor vorgestellten Daten, da die Metavinculin-Schwanzdomäne eine schwächere Affinität gegenüber sauren Phospholipiden aufweist und daher eine schlechtere Verdrängbarkeit der Bindung der Metavinculin-Schwanzdomäne an F-Aktin zu erwarten gewesen wäre. Möglicherweise ist dies durch eine Enfaltung der Metavinculin-Schwanzdomäne durch die Bindung an Aktinfilamente zu erklären. Eine detaillierte Diskussion dieses Phänomens findet sich in Kapitel 4.2.2.2.

3.4.1.3 Hetero-Oligomerisierung und Einfluss auf Aktin-Organisation

Da im lebenden Organismus Metavinculin nach allen bisher bekannten Daten (siehe auch Kapitel 3.3.3.1) nie ausschließlich allein, sondern immer zusammen mit Vinculin, wenn auch gewebsspezifisch unterschiedlich stark exprimiert wird, sollte die in Kapitel 3.4.1.1.3 bereits

angedeutete Bildung von MVT/VT-Heterodimeren und deren möglicher Einfluss auf die Organisation von Aktinfilamenten bei unterschiedlichen Verhältnissen beider Proteine näher charakterisiert werden.

3.4.1.3.1 Bei Inkubation mit PIP_2 bilden Metavinculin-Schwanz und Vinculin-Schwanz Heterodimere

Um zu analysieren, inwieweit die Präsenz saurer Phospholipide die Bildung von MVT/VT-Heterodi-, bzw. Oligomeren induzieren kann, wurden „chemical crosslink“-Experimente ähnlich wie in 3.4.1.2.1, jedoch mit beiden Proteinen in einem Ansatz durchgeführt. Dabei wurden in 10% - Schritten alle möglichen Zusammensetzungen beider Proteine mit einem 10-fachen molaren Überschuss PIP_2 (siehe Kapitel 3.4.1.2.1) inkubiert. Die Proben wurden wiederum im Western-Blot (α -FLAG) analysiert. Das Ergebnis des Versuchs ist in Abbildung 37 dargestellt.

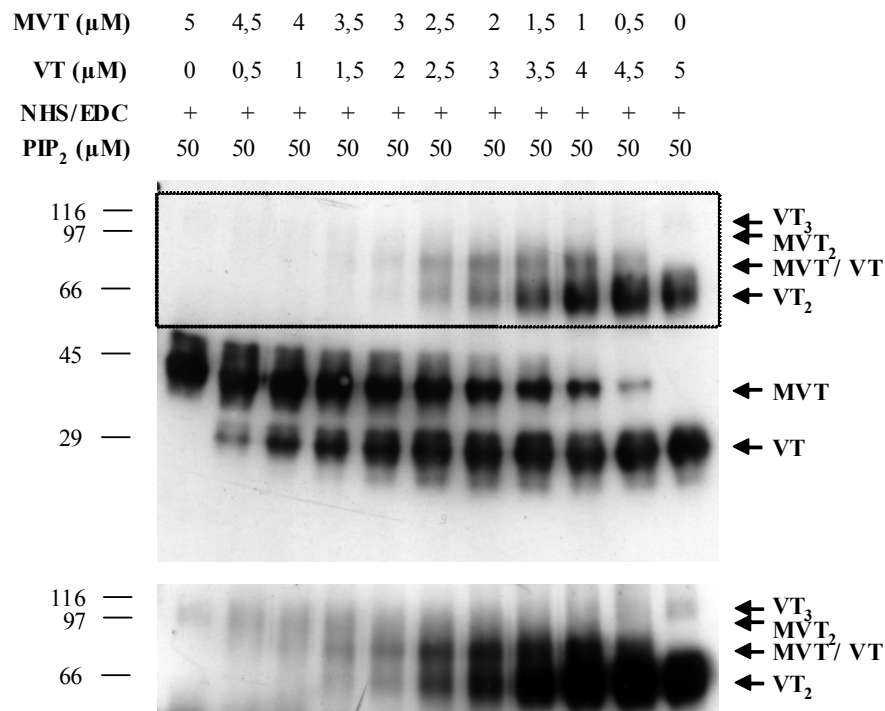


Abbildung 37: Charakterisierung der PIP_2 -induzierten Bildung von MVT/VT-Heterodimeren bei verschiedenen Kombinationen der Metavinculin- und der Vinculin-Schwanzdomäne

„Crosslink“ mit 10-fachem molaren Überschuss PIP_2 , Blot α -FLAG, „Crosslinker“: EDC/NHS. Der untere Teil der Abbildung zeigt den oben durch ein Rechteck markierten Ausschnitt nach längerer Exposition des Blots während der ECL-Entwicklung. PIP_2 induziert die Bildung von MVT/VT-Heterodimeren. MVT dimerisiert schlechter als VT und bewirkt schon bei geringem Anteil eine Herabsetzung der Größe der VT-Komplexe.

Beide Proteine allein zeigten nach Inkubation mit PIP_2 das schon in Abschnitt 3.4.1.2.1 beschriebene Dimerisierungsverhalten (Abbildung 37, Spur 1 und 11): Bei der Vinculin-Schwanzdomäne waren im Western-Blot Dimere sowie Oligomere nachweisbar, bei Metavinculin sehr viel schwächer nur Dimere. Schon bei einem Anteil von 10% der Metavinculin-Schwanzdomäne am Gesamtansatz waren keine höheren Vinculin-Schwanz-Oligomere mehr detektierbar (Abbildung 37, Spur 10).

Es zeigte sich des Weiteren, dass die Anwesenheit der Vinculin-Schwanzdomäne zur Bildung von VT/MVT-Heterodimeren führt. Dies war etwa ab einem prozentualen Anteil von 30% der Vinculinschwanzdomäne der Fall (Abbildung 37, Spur 4). Am deutlichsten waren diese VT/MVT-Heterodimere bei einem Verhältnis von 1:1 bis 4:1 (Vinculin:Metavinculin, Abbildung 37, Spur 6-9) erkennbar.

Die Anwesenheit der Vinculin-Schwanzdomäne bewirkte in keinem Ansatz die Bildung von Metavinculin-Schwanz-Homo-Di-, bzw. Oligomeren.

Die Phospholipid-induzierte Bildung von MVT/VT-Heterodimeren ließ sich auch im Saccharose-Lipidvesikel-Pulldownversuch (siehe Kapitel 2.2.2.14) nachweisen. Zu diesem Zweck wurde ein Gemisch von Vinculin- und Metavinculin-Schwanzdomäne auf die Bindung an Saccharose-gefüllte Lipidvesikel untersucht. Abbildung 39 zeigt das Ergebnis des Versuchs.

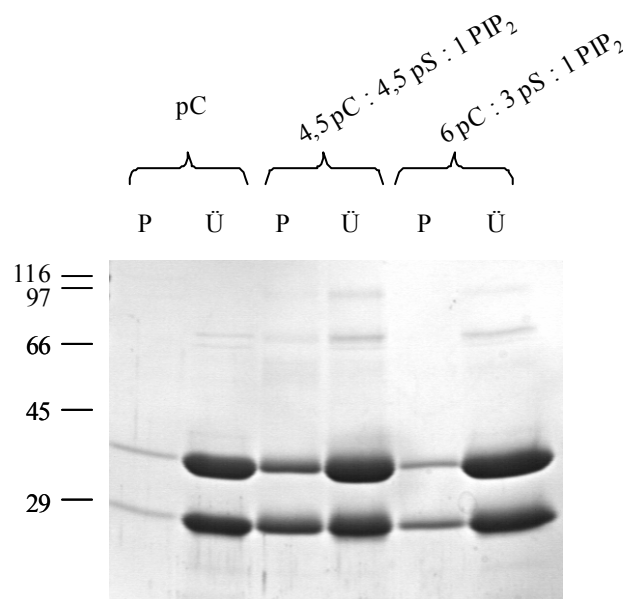


Abbildung 38: Untersuchung der Bildung von MVT/VT-Heterodimeren im Saccharose-Lipidvesikel-Pulldown

Bei Verwendung eines MVT/VT-Gemisches pelletiert die Metavinculin-Schwanzdomäne mit sauren Phospholipidvesikeln. Da sie allein im Überstand verbleibt (siehe Kapitel 3.4.1.2.2), ist dies vermutlich durch die Bildung von MVT/VT-Heterodimeren zu erklären. pC: Phosphatidylcholin, pS: Phosphatidylserin, PIP_2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, P: Pellet, Ü: Überstand

Die Vinculin-Schwanzdomäne wies in Anwesenheit wie in Abwesenheit der Metavinculin-Schwanzdomäne ähnliche Lipidbindungseigenschaften auf (siehe Kapitel 3.4.1.2.2, Abbildung 34). Im Falle der Metavinculin-Schwanzdomäne hingegen waren bei dem Mischansatz mit beiden Proteinen gravierende Unterschiede zu dem Ansatz ohne die Vinculin-Schwanzdomäne (siehe Kapitel 3.4.1.2.2) feststellbar, die Metavinculin-Schwanzdomäne zeigte nun ein mit der Vinculin-Schwanzdomäne vergleichbares Verhalten: In Anwesenheit der Vinculin-Schwanzdomäne war das Protein bei Verwendung von Lipidvesikeln, die saure Phospholipide enthielten, ebenfalls im Pellet zu finden, wenn auch in geringerem Maße als die Vinculin-Schwanzdomäne. Da die Metavinculin-Schwanzdomäne allein deutlich schlechter an saure Phospholipide bindet (siehe Kapitel 3.4.1.2.2), ist dies vermutlich durch die Bildung von MVT/VT-Heterodimeren zu erklären.

3.4.1.3.2 Filamente

Da in Metavinculin-exprimierenden Geweben eine Kolo-kalisation Metavinculins mit dem ubiquitär exprimierten Vinculin zu beobachten ist und die Schwanzdomänen beider Proteine *in vitro* in Gegenwart von F-Aktin Heterodimere bilden (siehe Kapitel 3.4.1.1.3), ist anzunehmen, dass beide Isoformen in der Zelle in die Verankerung von Aktinfilamenten mit der Zellmembran eingebunden sind. Von besonderem Interesse ist daher die Untersuchung des Einflusses verschieden zusammengesetzter MVT/VT-Gemische auf die Organisation von Aktinfilamenten. Dazu wurde F-Aktin mit unterschiedlich zusammengesetzten MVT/VT-Gemischen inkubiert und nach Markierung mit Phalloidin-TRITC fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 39).

Es zeigte sich, dass eine stufenweise Veränderung in der Zusammensetzung des MVT/VT-Gemisches eine graduelle Modifikation der Ausbildung von F-Aktinsuprastrukturen bewirkt: Je mehr Metavinculin-Schwanzdomäne sich anteilig im Ansatz befindet, desto flexibler und vernetzter wirken die Aktinfilamentsuprastrukturen. Geringe Mengen der Metavinculin-Schwanzdomäne bewirkten jedoch bereits insofern starke Veränderungen, als schon bei 10% MVT die induzierten Aktinstrukturen geschmeidiger wirken als bei 100% VT. Es fanden sich auch weniger kurze Filamentbündel.

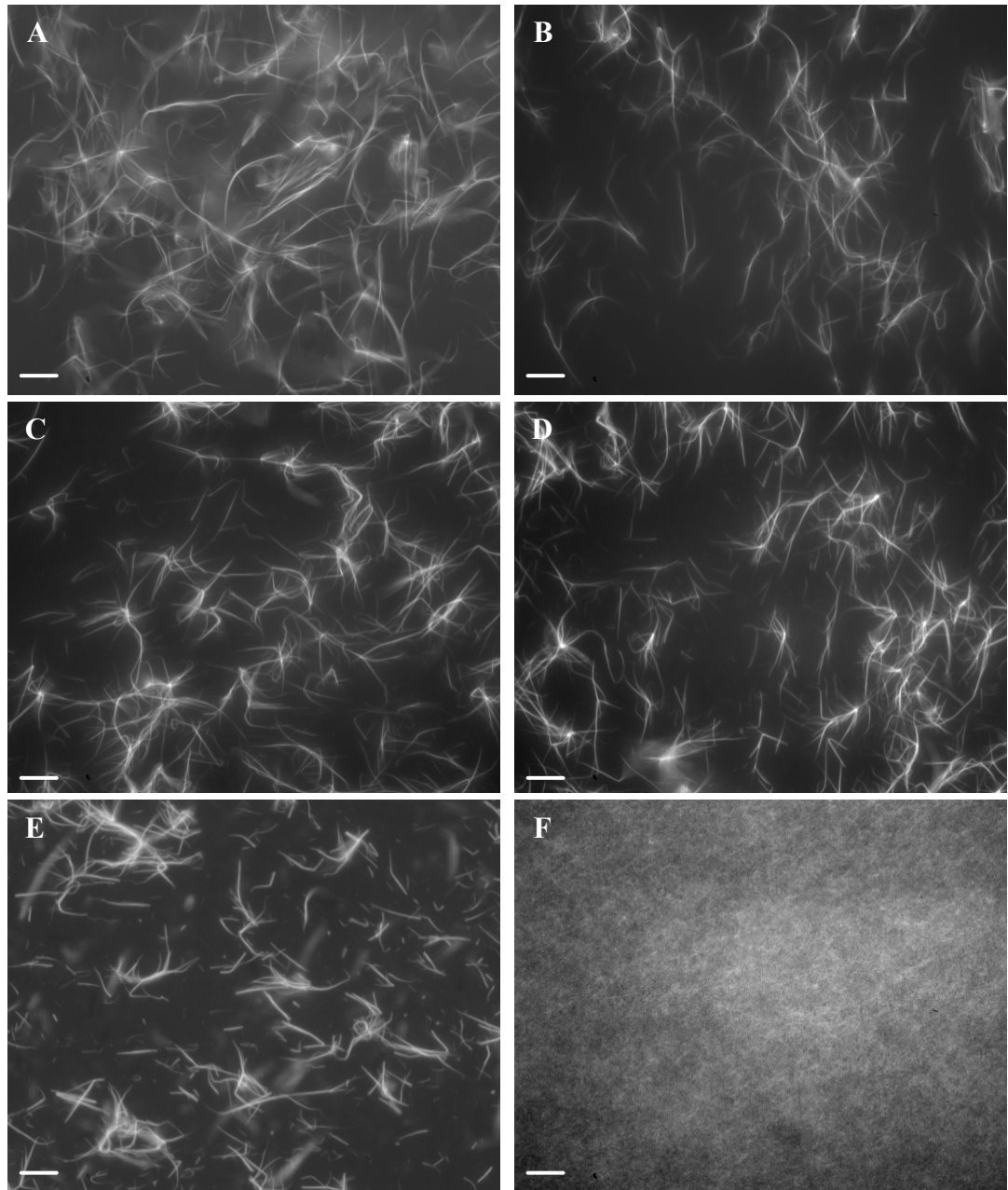


Abbildung 39: *In vitro*-Analyse der durch unterschiedliche VT/MVT-Gemische induzierten Aktinsuprastrukturen

Es zeigt sich eine graduelle Veränderung der Aktinsuprastrukturen bei stufenweiser Veränderung des VT/MVT-Verhältnisses. Je größer der Anteil der Vinculin-Schwanzdomäne im Ansatz, desto kürzer, dicker und unverzweigter erscheinen die Aktinfilamente. A) MVT B) 70 % MVT, 30 % VT, C) 50 % MVT, 50 % VT, D) 30 % MVT, 70 % VT E) VT F) Aktinkontrolle ohne (M)VT; Balken 10 μm

3.4.2 Gesamtproteine

Alle der bisher beschriebenen biochemischen Experimente wurden mit bakteriell exprimierten Schwanzdomänen von Vinculin und Metavinculin durchgeführt. Für die in den folgenden Kapiteln beschriebene biochemische Charakterisierung der Gesamtproteine wurden diese nach Feramisco & Burridge (1980) mit einer FPLC aus Putenmagengewebe aufgereinigt.

3.4.2.1 Metavinculin und Vinculin kosedimentieren nicht mit F-Aktin

Weder Vinculin noch Metavinculin kosedimentieren in „high speed“-Kosedimentationen mit F-Aktin. Bei Vinculin wird die F-Aktin-Bindungsstelle innerhalb der Schwanzdomäne des Proteins durch eine intramolekulare Kopf-Schwanz-Wechselwirkung maskiert (Johnson & Craig, 1995b; siehe auch Kapitel 1.1.4). Da auch Metavinculin in Kosedimentationsuntersuchungen nicht mit F-Aktin pelletiert werden konnte, nimmt die intramolekulare Kopf-Schwanz-Wechselwirkung vermutlich auch bei diesem Protein inhibitorischen Einfluss auf die Interaktion mit weiteren Liganden. Versuche, die intramolekulare Kopf-Schwanz-Wechselwirkung durch Inkubation mit sauren Phospholipiden zu lösen und das Protein anschließend mit F-Aktin zu kosedimentieren schlugen in beiden Fällen fehl (nicht gezeigt), wahrscheinlich aufgrund der bereits bekannten Kompetition von sauren Phospholipiden mit F-Aktin um die Bindung an die Vinculin- (Steimle et al., 1999), bzw. Metavinculin-Schwanzdomäne (siehe auch Kapitel 3.4.1.2.3). Da in neueren Untersuchungen die Kopf-Schwanz-Interaktion von Vinculin durch einen starken Überschuss eines Vinculin-bindenden Talinpeptides (VBS3 – Vinculin Binding Sequence 3) gelöst und das Protein so mit F-Aktin kosedimentiert werden konnte (Bass et al., 2002), sollte dies nun für Vinculin und Metavinculin im Vergleich durchgeführt werden. Das Ergebnis der Kosedimentationsanalysen ist in Abbildung 40 dargestellt.

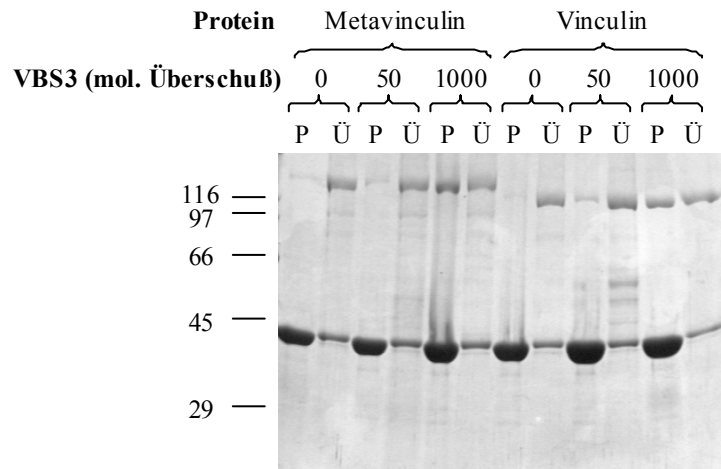


Abbildung 40: Vergleichende Untersuchung der Kopf-Schwanz-Interaktion von Vinculin und Metavinculin

Kosedimentationsanalyse von (Meta)Vinculin ohne, bzw. in Anwesenheit eines Talinpeptides (VBS3, nach Bass et al., 2002). P: Pellet, Ü: Überstand. Durch ein im 1000-fachen molaren Überschuss gegenüber (Meta)Vinculin eingesetztes Talinpeptid lässt sich die Kopf-Schwanz-Interaktion beider Proteine in ähnlicher Weise lösen, so dass beide Proteine an F-Aktin binden und mit diesem pelletieren.

Nach Inkubation mit einem Überschuss des Talinpeptids konnten beide Proteine in ähnlicher Weise mit F-Aktin kosedimentiert werden. Vermutlich wurde bei beiden Proteinen die Maskierung der F-Aktin-Bindungsstelle durch die Lösung der Kopf-Schwanz-Interaktion aufgehoben. Da identische molare Überschüsse des Talinpeptids auf die Lösung der Kopf-Schwanz-Interaktion offenbar einen ähnlichen Einfluss ausüben, ist die Affinität der Kopf-Schwanz-Interaktion wahrscheinlich bei Vinculin und Metavinculin sehr ähnlich.

3.4.2.2 Die Kopf-Schwanz- Interaktion ist für rekonstituiertes Metavinculin wie Vinculin in gleicher Weise durch Inkubation mit PIP_2 lösbar

Ziel des Versuchs war es herauszufinden, inwieweit die schwächere Bindung der Metavinculin-Schwanzdomäne an saure Phospholipide (siehe Kapitel 3.4.1.2.2) im Gesamtprotein zu einer veränderten Regulation der Kopf-Schwanz-Wechselwirkung führt. Zu diesem Zweck wurde rekombinante (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne (FLAG-„tag“, AS 858-1066, siehe Kapitel 3.1.1) zusammen mit über V8-Endoprotease-Verdau aus Gesamt-Vinculin gewonnenem Vinculin-Kopf in einem Ansatz mit steigenden Mengen PIP_2 inkubiert. Nach 15-minütiger Inkubationszeit wurde wie in

Kapitel 2.2.2.13 beschrieben, dem Ansatz ein chemischer „crosslinker“ (EDC/NHS) zugegeben. Die Ansätze wurden im Western-Blot mittels einer α -FLAG-Entwicklung analysiert (Abbildung 41).

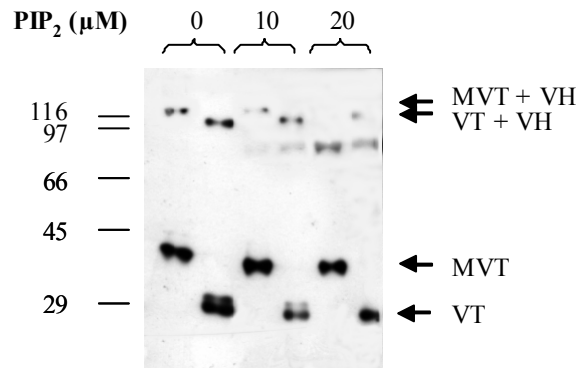


Abbildung 41: Untersuchung des Einflusses von PIP_2 auf die Kopf-Schwanz-Interaktion bei Vinculin und Metavinculin

EDC/NHS-„crosslink“ von Vinculin-Kopf mit rekombinanten-(Meta)Vinculin-Schwanzdomänen (jeweils $1\mu\text{M}$) bei steigenden molaren Überschüssen PIP_2 (wie in der Abbildung angegeben), Entwicklung α -FLAG. PIP_2 hat bei beiden Proteinen einen ähnlichen Einfluss auf die Lösung der Kopf-Schwanz-Interaktion. MVT: FLAG-Metavinculin-Schwanzdomäne ($\text{MVT}_{858-1066}$), VT: FLAG-Vinculin-Schwanzdomäne ($\text{VT}_{858-1066}$), VH: Vinculin-Kopf nach V8-Proteasespaltung

Der Versuch ergab, dass bei Inkubation getrennter Kopf- und Schwanzdomänen in Abwesenheit von PIP_2 bei beiden Proteinen durch die Kopf-Schwanz-Interaktion ein Komplex entsteht, dessen Molekulargewicht den entsprechenden Gesamtproteinen sehr ähnelt (siehe Abbildung 41). In Gegenwart steigender Mengen PIP_2 verschwindet dieser Komplex jedoch zugunsten der getrennten Domänen. Dies spricht für eine ähnliche Regulation der Kopf-Schwanz-Interaktion durch PIP_2 bei beiden Proteinen.

3.4.2.3 Metavinculin und Vinculin pelletieren nicht mit Saccharose-gefüllten Lipidvesikeln

Wie die rekombinanten Schwanzdomänen, so sollten nun auch Vinculin und Metavinculin auf ihre Bindung an saure Phospholipide hin untersucht werden. Wenngleich saure Phospholipide auf die Lösung der Kopf-Schwanz-Interaktion einen ähnlichen Effekt ausüben, ist es doch schwierig, aus den entsprechenden Western-Blot-Analysen Schlüsse auf die relative Affinität der Gesamtproteine gegenüber sauren Phospholipiden zu ziehen. Die Western-Blot-Analysen wurden mit aus getrennten Kopf- und Schwanzdomänen rekonstituierten Gesamtproteinen durchgeführt, deren Anordnung unter Umständen von den nativen Proteinen abweichen könnte. Aus diesem Grund wurde vergleichend die

Bindung der aus Putenmagen aufgereinigten nativen Proteine an Saccharose-gefüllte Lipidvesikel untersucht (Abbildung 42).

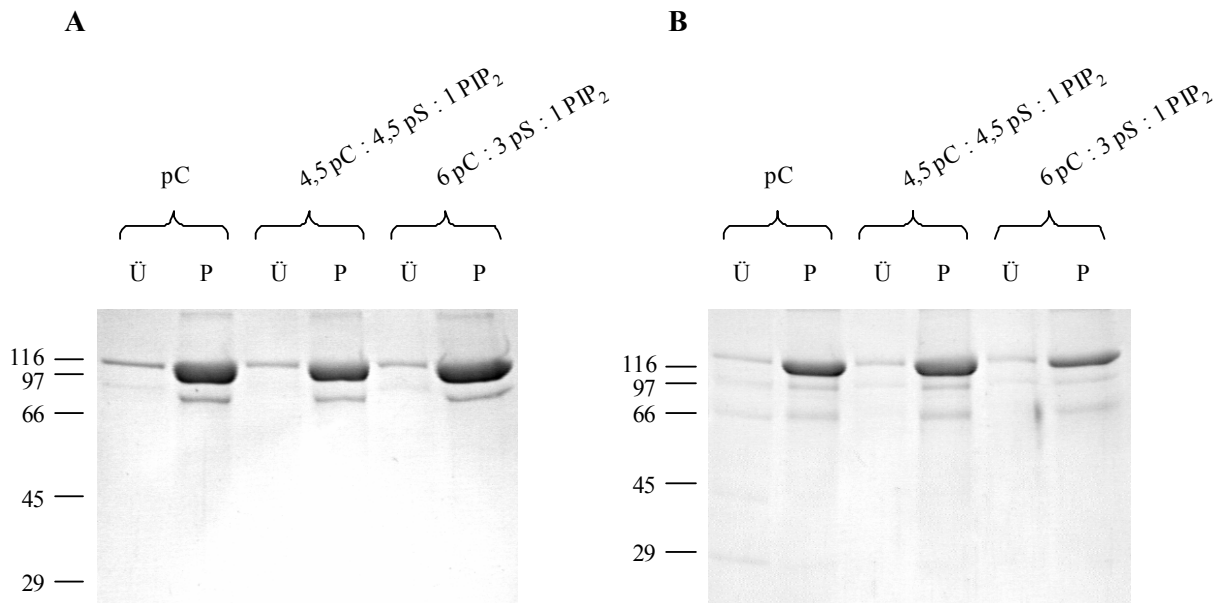


Abbildung 42: Untersuchung der Bindung (Meta)Vinculins an Saccharose-gefüllte Lipidvesikel

Saccharose-Lipidvesikel-Pulldown Ü: Überstand, P: Pellet, pC: Phosphatidylcholin, pS: Phosphatidylserin, PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Weder Vinculin (A), noch Metavinculin (B) pelletiert mit Saccharose-gefüllten Lipidvesikeln, auch dann nicht, wenn diese saure Phospholipide enthalten. Vermutlich ist dies durch die Konkurrenz der Lipidbindung mit der intramolekularen Kopf-Schwanz-Interaktion zu erklären.

Im Gegensatz zu den mit den rekombinanten Schwanzdomänen erzielten Ergebnissen, konnte weder Metavinculin, noch Vinculin, dessen Schwanzdomäne im gleichen Versuch eine deutliche Bindung an saure Phospholipide aufweist, mit Saccharose-gefüllten Lipidvesikeln pelletiert werden. Vermutlich ist dies durch eine Konkurrenz der Bindung saurer Phospholipide mit der Bindung des Vinculinkopfes an die (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne zu erklären. In der Zelle ist eine dauerhafte Öffnung des Proteins vermutlich erst bei gleichzeitiger Interaktion der Kopfdomäne mit bereits in Adhäsionsstrukturen vorhandenen Kopfliganden möglich. Das große Strukturprotein Talin ist dafür möglicherweise von großer Bedeutung, denn einerseits wird es offenbar früher in wachsende Fokalkontakte inkorporiert als Vinculin (Moulder et al., 1996), andererseits konnte gezeigt werden, dass hohe molare Überschüsse eines Talinpeptides die Kopf-Schwanz-Interaktion von Vinculin schwächen können (Bass et al., 2002). Eine detaillierte Diskussion der Regulation von Vinculin und Metavinculin findet sich in Kapitel 4.2.

3.4.3 Zusammenfassung

Die folgenden Tabellen fassen die unter anderem im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten biochemischen Daten der Schwanzdomänen sowie der nativen Gesamtproteine zusammen. In Tabelle 10 sind die Daten der Schwanzdomänen aufgeführt, Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse für die Gesamtproteine.

Tabelle 10: Zusammenstellung der biochemischen Eigenschaften der untersuchten (Meta)Vinculin-Schwanzdomänen

NU: Nicht untersucht, MVT-CMP₈₅₈₋₁₀₆₆: Mutierte Metavinculin-Schwanzdomänen (3 Mutanten, assoziiert mit humanen Cardiomyopathien, siehe Kapitel 1.2.3)

	VT ₈₅₈₋₁₀₆₆	MVT ₈₅₈₋₁₀₆₆	MVT- NNQ ₈₅₈₋₁₀₆₆	MVT- QNQ ₈₅₈₋₁₀₆₆	MVT- CMP ₈₅₈₋₁₀₆₆
Aktinbindung	Ähnlich, keine zusätzliche Aktinbindungsstelle im MVI		NU	NU	Ähnlich wie MVT ₈₅₈₋₁₀₆₆
Aktinfilamentorganisation	Bündel	Netzwerke			Siehe Olson et al., 2002
Bindung saurer Phospholipide	Gut	Schlecht	Intermediär zwischen VT und MVT		NU
CD-Spektrum	Ähnlich, vorwiegend α -Helices				NU
Homooligomerisierung	Gut	Schlecht	Gut	Gut	Schlecht
Heterooligomerisierung	Gut	Gut	Gut	Gut	Gut

Die biochemische Charakterisierung der Schwanzdomänen von Vinculin und Metavinculin zeigt, dass der Metavinculin-Einschub Interaktionen im Bereich der Schwanzdomäne negativ beeinflusst. Dazu zählen sowohl die Bindung saurer Phospholipide als auch die Bindung weiterer Metavinculin-Schwanzdomänen (Homooligomerisierung). Mutanten, in denen die saure Ladung des Metavinculin-Einschubs durch Einbringen neutraler Aminosäuren abgeschwächt wurde, binden deutlich besser als das MVT-Wildtypprotein an saure Phospholipide und bilden deutlich besser Homooligomere. Auch diese Ladungsmutanten binden jedoch nicht so gut an saure Phospholipide wie die Vinculin-Schwanzdomäne. Diese Untersuchungen zeigen, dass die saure Ladung des Metavinculin-Einschubs zwar von Bedeutung für die modulative Veränderung von Ligandenbindungseigenschaften, jedoch nicht allein dafür verantwortlich ist (detaillierte Diskussion in Kapitel 4.2.2.1).

Tabelle 11: Biochemische und zellbiologische Eigenschaften von nativem Vinculin, bzw. Metavinculin

	Vinculin	Metavinculin
Aktinbindung	Ähnlich (nur nach Lösung der Kopf-Schwanz-Interaktion)	
Bindung saurer Phospholipide (SLV)	Negativ, auch bei Inkubation des Proteins mit Talinpeptid (VBS3)	
Lösung der Kopf-Schwanz-Interaktion durch saure Phospholipide	Ähnlich	
Subzelluläre Lokalisation	Adhärenzverbindungen	
Expression	Ubiquitär	Glatt- und Skelettmuskel

Durch die Maskierung von Ligandenbindungsstellen durch eine intramolekulare Kopf-Schwanz-Wechselwirkung gestaltete sich die biochemische Charakterisierung der Gesamtproteine schwieriger als im Falle der rekombinanten Schwanzdomänen. Durch Inkubation mit einem Talinpeptid (VBS3, nach Bass et al., 2002) konnte die Kopf-Schwanz-Interaktion bei beiden Proteinen in ähnlicher Weise gelöst und so eine Sedimentation mit Aktinfilamenten erreicht werden. Bei der Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber sauren Phospholipiden gelang dies aufgrund von technischen Problemen während des Saccharose-Lipidvesikel-„pulldowns“ und von Limitationen beim Einsatz des Talinpeptides nicht. Metavinculin und Vinculin zeigten eine prinzipiell ähnliche subzelluläre Lokalisation, die Expression beider Proteine in muriner Muskulatur wies jedoch einige Unterschiede auf.

4 Diskussion

Neben dem bisher recht ausführlich charakterisierten Vinculin existiert mit der Spleißvariante Metavinculin ein Protein, das bisher kaum untersucht ist. Verschiedene Studien deuten jedoch darauf hin, dass Metavinculin eine bedeutende Funktion für die strukturelle Integrität und Funktion des Herzens übernimmt, denn sowohl das Fehlen als auch die Mutation von Metavinculin korreliert beim Menschen mit dem Auftreten von dilatativer Cardiomyopathie. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktionsweise von Metavinculin näher zu charakterisieren.

Denkbar wäre eine strukturelle oder eine modulative Wirkungsweise von Metavinculin:

Einerseits nimmt der Metavinculin-Einschub mit 68-79 Aminosäuren rund ein Viertel der Metavinculin-Schwanzdomäne ein. Der Hypothese, dass ein solch großer Einschub spezifische Bindungsaktivität für bisher unbekannte Proteine besitzen könnte, wurde durch die Suche neuer Liganden im „Yeast Two-Hybrid“ System nachgegangen (siehe Kapitel 4.1).

Andererseits deutet die Größe wie auch die starke negative Ladung des Metavinculin-Einschubs auf eine mögliche modulative Beeinflussung von Ligandenwechselwirkungen innerhalb der Metavinculin-Schwanzdomäne hin. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden daher die biochemischen Eigenschaften von Metavinculin und Vinculin insbesondere im Hinblick auf die Bindung saurer Liganden miteinander verglichen (siehe Kapitel 4.2).

Die intensive biochemische Charakterisierung von Vinculin während der letzten Jahre hat nicht nur einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Proteins beigetragen, sondern liefert auch eine breite Palette verschiedener etablierter Analysemethoden, anhand derer die Eigenschaften von Metavinculin untersucht und mit Vinculin verglichen werden konnten. Die deutliche Domänenstruktur von Metavinculin, bzw. Vinculin erleichtert die biochemische Charakterisierung der Proteine, denn sie unterscheiden sich nur innerhalb der relativ kleinen Schwanzdomäne, die sich leicht bakteriell exprimieren und aufreinigen lässt.

4.1 Spezifische Liganden

Ein möglicher funktioneller Unterschied zwischen der Vinculin- und Metavinculin-Schwanzdomäne könnte in der Bindung spezifischer Liganden bestehen. Mit dem Ziel neue Liganden der Metavinculin-Schwanzdomäne zu identifizieren, wurde unter Verwendung dreier Genbanken (Kapitel 2.2.2.16) und unterschiedlicher Metavinculin-Schwanz Köder (Kapitel 3.2) das „Yeast Two-Hybrid“ System eingesetzt.

Obwohl die Bestätigung bekannter Interaktionspartner der prolinreichen Nackenregion von Vinculin für eine Funktionalität des „Yeast Two-Hybrid“ Systems spricht, konnten neue Metavinculin-spezifische Liganden nicht identifiziert werden. Aufgrund dieser Daten kann die Existenz eines

spezifischen Metavinculin-Bindungspartners zwar nicht ausgeschlossen werden, sie verliert jedoch aufgrund des Einsatzes vielfältiger Köderproteine und mehrerer Genbanken an Wahrscheinlichkeit (Kapitel 2.1.4 und 3.2).

Mit Hilfe des „Yeast Two-Hybrid“ Systems konnte kürzlich von Hüttelmaier et al. ein bisher unbekanntes Protein - Raver1 - identifiziert werden, welches sowohl an die Metavinculin- als auch an die Vinculin-Schwanzdomäne bindet (Hüttelmaier et al., 2001). Die Metavinculin-Raver1-Interaktion scheint jedoch etwa 10-fach stärker zu sein als die Interaktion des Proteins mit Vinculin, obwohl der Metavinculin-Einschub offenbar nicht direkt an der Bindung beteiligt ist. Wie sich am Beispiel der Bindung von Raver1 zeigt, könnte der Metavinculin-Einschub von besonderer Bedeutung für die Modulation von Interaktionen im Bereich der Metavinculin-Schwanzdomäne sein. Bereits 1998 wurde von Rüdiger et al. im Zusammenhang mit einer differentiellen Organisation von Aktinfilamenten *in vitro* vermutet, dass das Fehlen echter Metavinculin-spezifischer Liganden auf eine eher modulatorische Funktion des Metavinculin-Einschubs hindeuten könnte (Rüdiger et al., 1998). Für einen modulatorischen Einfluss des Metavinculin-Einschubs auf Interaktionen insbesondere innerhalb der Metavinculin-Schwanzdomäne spricht auch der Einfluss von Mutationen innerhalb des Metavinculin-Einschubs auf die Organisation von Aktinfilamenten *in vitro* (Olson et al., 2002).

4.2 Modulation der Aktivierung und Ligandenwechselwirkung

Neben Aktin-bindenden Proteinen wie z.B. Profilin (Chaudary et al., 1998; Lassing & Lindberg, 1985; Sohn et al., 1995), Talin (Heise et al., 1991; Tempel et al., 1995) oder α -Actinin (Fukami et al., 1992; Fukami et al., 1996) wird auch Vinculin durch saure Phospholipide regulierend beeinflusst.

Seit der Entdeckung von Vinculin haben intensive biochemische Untersuchungen das Verständnis der Regulation des Proteins zunehmend erweitert, es wurden wiederholt Modelle aufgestellt, deren Komplexität und Detailliertheit sich in den letzten Jahren immer weiter gesteigert hat: Die Aufhebung der strukturellen Maskierung zahlreicher Ligandenbindungsstellen von Vinculin durch die intramolekulare Kopf-Schwanz-Wechselwirkung in Gegenwart saurer Phospholipide führte ursprünglich zu Modellvorstellungen, denzufolge die Aktivierung von Vinculin durch saure Phospholipide in einem einzigen Schritt erfolgt. Erst die Aufklärung der Vinculin-Schwanz-Kristallstruktur ermöglichte den Vergleich mit dem strukturell verwandten Protein Apolipoprotein E, das wie die Vinculin-Schwanzdomäne aus einem Bündel antiparallel angeordneter α -Helices besteht und dessen Bündel sich bei Bindung von Lipiden vollständig entfaltet (Bakolitsa et al., 1999). Die Veränderung der Sensitivität gegenüber Proteasen nach der Bindung an saure Phospholipide führte zu der Vermutung, dass auch die Vinculin-Schwanzdomäne entfaltet werden kann. Konsequenz war die Entwicklung einer Modellvorstellung, nach der die Phospholipid-induzierte Aktivierung von Vinculin eher in einem Zweischnittmechanismus erfolgt. Danach würde die intramolekulare Kopf-Schwanz-

Wechselwirkung durch die Bindung saurer Phospholipide an den extremen C-Terminus des Proteins gelöst und anschließend die Schwanzdomäne durch eine Interaktion hydrophober und basischer Regionen innerhalb der Vinculin-Schwanzdomäne mit Phospholipiden entfaltet (Abbildung 43).

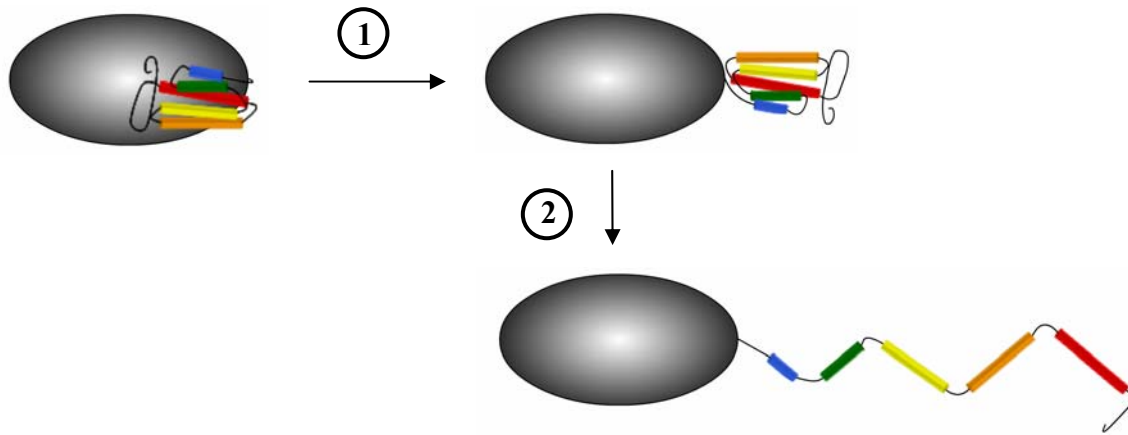


Abbildung 43: Schematische Darstellung des Zweischnittmechanismus bei der Konformationsänderung von Vinculin.

Die Kopf-Schwanz-Interaktion von Vinculin wird durch saure Phospholipide gelöst (1). Die Vinculin-Schwanzdomäne ändert bei Bindung an saure Phospholipide oder F-Aktin ihre Konformation (2). Die Orientierung der Schwanzdomäne gegenüber der Kopfdomäne sowie ihre Konformation im entfalteten Zustand sind rein hypothetisch. Darstellung der Vinculin-Kopfdomäne wie in Abb. 4, Schwanzdomäne nach Abb. 3.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse sprechen eindeutig für eine in zwei Schritten ablaufende Aktivierung von Vinculin. Auch die für Metavinculin im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundenen deutlichen Unterschiede zu Vinculin lassen sich am besten mit diesem Zweischnitt-Modell erklären. Diese Unterschiede könnten sich auf den Aktivierungsmechanismus des Proteins auswirken. So wurden beispielsweise Differenzen in der Interaktion beider Schwanzdomänen mit sauren Phospholipiden festgestellt, wie der stark saure Charakter des Metavinculin-Einschubs innerhalb der Schwanzdomäne bereits vermuten ließ.

Im Folgenden werden die möglichen Konsequenzen veränderter biochemischer Eigenschaften von Metavinculin auf Unterschiede in Regulation und Ligandenwechselwirkung anhand des oben angesprochenen Modells (Abbildung 43) im Vergleich zu Vinculin erläutert.

4.2.1 Kopf-Schwanz-Interaktion

Wie durch biochemische Untersuchungen festgestellt werden konnte, ist die Öffnung von Vinculin durch saure Phospholipide von kritischer Bedeutung für seine Interaktion mit weiteren Liganden (Gilmore & Burridge, 1996). Ein Fehlen der Bindungsaktivität von Vinculin hat gravierende Konsequenzen, wie sich bei „knock-out“-Experimenten in der Maus sowie einem Ausschalten der Vinculinexpression durch homologe Rekombination oder antisense-Transfektion in Zellen zeigte (Coll et al., 1995; Rodriguez Fernandez et al., 1992; Rodriguez Fernandez et al., 1993; Xu et al., 1998b). Eine Modulation der Kopf-Schwanz-Interaktion durch den Metavinculin-Einschub könnte sich daher deutlich auf die Funktion des Proteins in der Zelle auswirken. Aus diesem Grund wurde die Kopf-Schwanz-Wechselwirkung bei Metavinculin und Vinculin vergleichend untersucht.

Für den regulatorischen Einfluss der intramolekularen Kopf-Schwanz-Wechselwirkung konnte bei Metavinculin und Vinculin im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Vermutlich wirkt die Kopf-Schwanz-Interaktion bei beiden Proteinen in ähnlicher Weise inhibierend auf die Interaktion mit weiteren Liganden des Proteins: Metavinculin wie auch Vinculin binden nicht ohne vorhergehende Aktivierung an Aktinfilamente, da die Aktin-Bindungsstellen innerhalb der Schwanzdomäne vermutlich durch die Kopf-Schwanz-Wechselwirkung maskiert werden. Erst bei Inkubation des Gesamtmoleküls mit einem hohen molaren Überschuss eines Talinpeptids, das an die Kopfdomäne bindet und somit vermutlich die Kopf-Schwanz-Interaktion löst (Bass et al., 2002), konnte für beide Isoformen in Kosedimentationsstudien eine Bindung an Aktinfilamente erzielt werden (Abbildung 40). Dies deutet auch auf eine ähnliche Affinität beider Schwanzdomänen für die Vinculin-Kopfdomäne hin. Eine ähnlich affine Kopf-Schwanz-Wechselwirkung wurde bereits 1998 in quantitativen „Yeast Two-Hybrid“-Analysen gezeigt (Rüdiger et al., 1998).

Die Konformation beider Proteine wird offenbar in ähnlicher Weise durch saure Phospholipide reguliert, denn eine Rekonstitution beider Gesamtmoleküle aus den isolierten Einzeldomänen wird durch Anwesenheit von PIP_2 inhibiert (Abbildung 32).

Nach Klärung der Kristallstruktur und einigen weiterführenden biochemischen Experimenten wurde bereits von Bakolitsa et al. postuliert, dass der hydrophobe Finger in Kombination mit dem die Schwanzdomäne umfassenden basischen Kragen für die initiale Interaktion und Aktivierung des geschlossenen Proteins mit sauren Phospholipiden verantwortlich ist (Bakolitsa et al., 1999). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigen diese Theorie, denn im Gegensatz zur Situation bei der isolierten Schwanzdomäne (siehe Kapitel 4.2.2.1) interferiert im rekonstituierten Gesamtprotein der Metavinculin-Einschub nicht mit der Öffnung des Proteins. Dies spricht dafür, dass für die Lösung der Kopf-Schwanz-Interaktion die Wechselwirkung saurer Phospholipide mit dem extremen C-Terminus des Proteins ausreicht, während die Lipidbindungsregion in der Helix 3 der Schwanzdomäne für diesen Schritt offenbar nicht von Bedeutung ist. Obwohl die Tertiärstruktur der Metavinculin-

Schwanzdomäne bisher unbekannt ist, lässt sich aus den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen schließen, dass der Metavinculin-Einschub so angeordnet ist, dass er nicht mit einer Bindung saurer Phospholipide an den basischen Kragen/bzw. hydrophoben Finger interferiert (Abbildung 44).

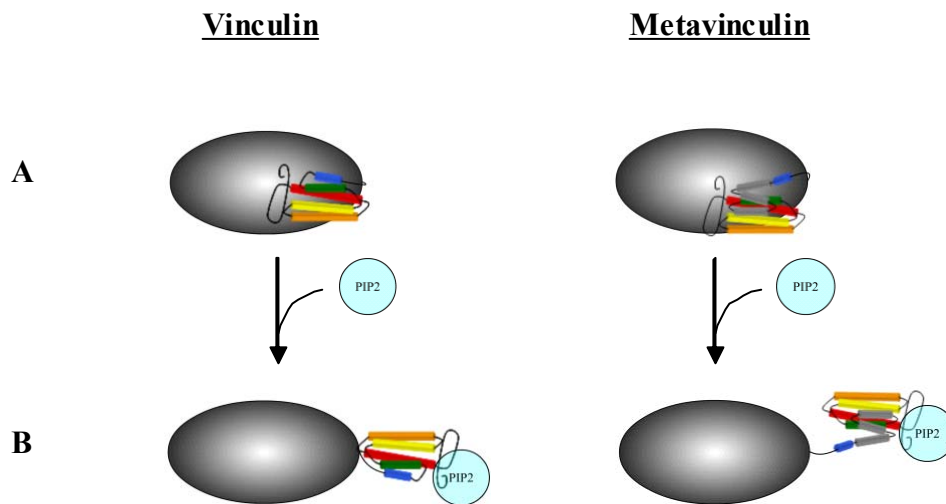


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Kopf-Schwanz-Interaktion bei Vinculin und Metavinculin

Die Affinität der Kopf-Schwanz-Interaktion ist bei beiden Proteinen offenbar sehr ähnlich. Sie wird in ähnlicher Weise durch die Interaktion der Schwanzdomäne mit sauren Phospholipiden geschwächt. Vesikel saurer Phospholipide sind hier schematisch als blauer Kreis (PIP2) dargestellt. Darstellung der Vinculin-Kopfdomäne wie in Abb. 4, Schwanzdomäne nach Abb. 3. A) zeigt Vinculin und Metavinculin schematisch in geschlossenem Zustand, unter B) ist schematisch die durch Bindung von sauren Phospholipiden bewirkte Öffnung des Proteins vergleichend für Vinculin und Metavinculin dargestellt.

4.2.2 Entfaltung der Schwanzdomäne

Wie in Kapitel 1.1.4 und 1.1.5 im Detail beschrieben, besitzen sowohl saure Phospholipide als auch das saure F-Aktin zwei Bindungsstellen innerhalb der Vinculin-Schwanzdomäne (Hüttelmaier et al., 1997, 1998; Johnson & Craig, 1995b, Johnson & Craig, 1998). Die simultane Bindung von sauren Phospholipiden und F-Aktin ist aufgrund einer partiellen Überlappung der Bindungsstellen offenbar nicht möglich (Steimle et al., 1999), die Interaktion mit zwei Bindungsstellen induziert jedoch in beiden Fällen eine Konformationsänderung der Vinculin-Schwanzdomäne (Bakolitsa et al., 1999; Johnson & Craig, 2000). Die räumliche Nähe des sauren Metavinculin-Einschubs zu den Bindungsstellen für diese sauren Liganden innerhalb der Schwanzdomäne ließ eine Modulation der Bindung und somit möglicherweise der Entfaltung der Metavinculin-Schwanzdomäne bereits vermuten. Aus diesem Grund war die vergleichende Charakterisierung der Interaktion mit diesen Liganden von zentraler Bedeutung.

4.2.2.1 Saure Phospholipide

Bezüglich der Bindung an saure Phospholipide konnten in der vorliegenden Untersuchung deutliche Unterschiede zwischen der Vinculin- und der Metavinculin-Schwanzdomäne erzielt werden. Wie mit Hilfe von Saccharose-Lipidvesikel-Pulldownversuchen gezeigt werden konnte, bindet die Metavinculin-Schwanzdomäne mit deutlich geringerer Affinität als die Vinculin-Schwanzdomäne an saure Phospholipide (Abbildung 34). Offenbar ist die negative Ladung des Metavinculin-Einschubs für die Bindung an saure Phospholipide von kritischer Bedeutung, denn durch eine Abschwächung der negativen Ladung des Metavinculin-Einschubs per Mutagenese konnte die Bindung saurer Phospholipide an die Metavinculin-Schwanzdomäne in diesem Versuch signifikant verbessert werden (Abbildung 35). Auch bei einem Austausch saurer durch neutrale Aminosäuren bleibt die Bindungsfähigkeit gegenüber sauren Phospholipiden jedoch immer geringer als im Falle von Vinculin. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass nicht ausschließlich die negative Ladung des Metavinculin-Einschubs für eine Inhibition der Bindung verantwortlich gemacht werden kann, unter Umständen interferiert der Metavinculin-Einschub auch strukturell mit der Bindung saurer Phospholipide an die Schwanzdomäne.

Die Position des Metavinculin-Einschubs innerhalb der Vinculin-Schwanzdomäne sowie ein ähnlicher Einfluss von sauren Phospholipiden auf die Kopf-Schwanz-Interaktion deuten darauf hin, dass sich der inhibitorische Einfluss des Metavinculin-Einschubs nicht auf die Interaktion saurer Phospholipide mit dem hydrophoben Finger / basischen Kragen am C-Terminus des Proteins auswirkt. Wenngleich über die Anordnung des Metavinculin-Einschubs innerhalb der Metavinculin-Schwanzdomäne noch keine Daten vorliegen, lässt sich ein störender Einfluss des Metavinculin-Einschubs auf die Lipidbindungseigenschaften der hydrophoben und basischen Helix 3 der Vinculin-Schwanzdomäne recht gut durch enge räumliche Nähe beider Strukturen erklären. In Zusammenhang mit der Auflösung der Kristallstruktur der Vinculin-Schwanzdomäne wurde postuliert, dass eine sequenzielle Interaktion saurer Phospholipide mit zwei Bereichen der Vinculin-Schwanzdomäne zu einer Entfaltung des helikalen Bündels führt (Bakolitsa et al., 1999). Eine schwächere Interaktion der Metavinculin-Schwanzdomäne gegenüber sauren Phospholipiden könnte in diesem Sinne darauf hindeuten, dass die Metavinculin-Schwanzdomäne nicht so effektiv entfaltet werden kann wie die Vinculin-Schwanzdomäne (Abbildung 45). Mögliche Konsequenzen dieser Eigenschaft werden in Kapitel 4.4 diskutiert.

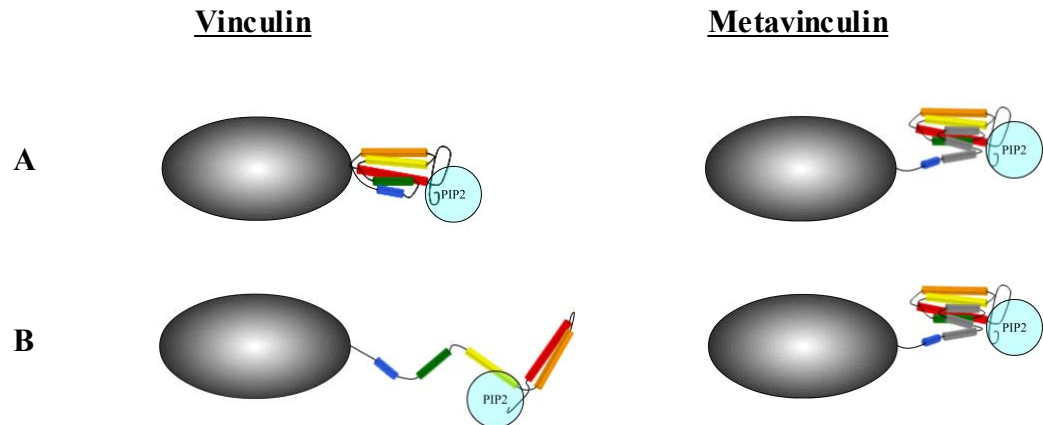


Abbildung 45: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Bindung von Vinculin und Metavinculin an saure Phospholipide

Die Vinculin-Schwanzdomäne bindet mit signifikant höherer Affinität an saure Phospholipide als die Metavinculin-Schwanzdomäne. Dies ist möglicherweise auf einen inhibitorischen Einfluss des Metavinculin-Einschubs auf die Bindung saurer Phospholipide an die Helix 3 der Metavinculin-Schwanzdomäne zurückzuführen. Darstellung der Kopfdomäne stark vereinfacht als graues Oval, Farbgebung der α -Helices der Schwanzdomäne nach Bakolitsa et al., 1999. Die Anordnung der drei α -Helices des Metavinculin Einschubs (grau) ist rein hypothetisch.

4.2.2.2 Aktin

Wie durch morphologische und funktionelle Veränderungen von Zellen ohne Vinculin gezeigt werden konnte, ist die Hauptfunktion von Vinculin vermutlich die Verbindung des Aktin-Cytoskeletts mit Adhäsionsverbindungen (Coll et al., 1995; Ezzell et al., 1997; Rodriguez Fernandez et al., 1993). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte durch Kosedimentationsanalysen nachgewiesen werden, dass nach dem Lösen der Kopf-Schwanz-Interaktion durch ein in hohem molaren Überschuss eingesetztes Talinpeptid auch Metavinculin an F-Aktin binden kann (Abbildung 40). Unterschiede bezüglich der Affinität der F-Aktin-Bindung konnten in Kosedimentationen der Schwanzdomänen mit F-Aktin nicht verzeichnet werden (Abbildung 28). Dennoch ist auch in Zusammenhang mit der Bindung an F-Aktin ein modulierender Einfluss des Metavinculin-Einschubs vorhanden, denn dieser bewirkt bei Inkubation der Metavinculin-Schwanzdomäne mit Aktinfilamenten *in vitro* eine verglichen mit der Vinculin-Schwanzdomäne unterschiedliche Organisation von Aktinfilamenten (Abbildung 27). Offenbar ist dies nicht auf eine zusätzliche Aktin-Bindungsaktivität des Metavinculin-Einschubs zurückzuführen (Persönliche Mitteilung Dr. S. Illenberger), möglicherweise ist die Veränderung der Organisation von Aktinfilamenten aber durch eine modulierte räumliche Anordnung der beiden F-Aktin-Bindungsregionen oder aber durch eine Beeinflussung des Oligomerisierungsverhaltens der Metavinculin-Schwanzdomäne zu erklären.

Da es sich auch bei Aktin um einen sauren Liganden der Vinculin-Schwanzdomäne handelt und die Bindungsstellen für Aktin und saure Phospholipide im vorderen Bereich des Proteins teilweise überlappen, stellt sich die Frage, aus welchem Grund sich im Gegensatz zu sauren Phospholipiden der Metavinculin-Einschub weniger stark auf die Bindung von F-Aktin auswirkt. Möglicherweise ist dies ein erster Hinweis auf eine präferentielle Bindung von Aktin an die Helix 5 der Vinculin-Schwanzdomäne. Da der Metavinculin-Einschub räumlich weiter von der Helix 5 als von der Helix 3 entfernt ist, ist sein modulatorischer Einfluss auf Ligandenwechselwirkungen in diesem Bereich vermutlich weniger stark. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass Hüttelmaier et al. mit MBP-Deletionskonstrukten der Vinculin-Schwanzdomäne eine gegenüber der Helix 5 stärkere Bindung der Helix 3 an F-Aktin zeigen konnten (Hüttelmaier et al., 1997). Neuere Untersuchungen mit *in vitro*-translatierten Deletionskonstrukten deuten jedoch auf eine höhere Affinität der Helix 5 gegenüber F-Aktin hin (Persönliche Mitteilung Dr. Susanne Illenberger). Eindeutige Aussagen über eine präferentielle Bindung von Aktin an eine der beiden Bindungsstellen der Vinculin-Schwanzdomäne sind bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich, dieses Problem bedarf weiterer Untersuchungen. Wie bereits erläutert, ist die Phospholipid-induzierte Entfaltung der Vinculin-Schwanzdomäne durch die sequentielle Interaktion mit zwei Bindungsstellen innerhalb der Vinculin-Schwanzdomäne zu erklären. Auch F-Aktin kann an zwei Stellen in der Vinculin-Schwanzdomäne binden und diese vermutlich so entfalten. Saure Phospholipide und Aktinfilamente unterscheiden sich in ihrer Struktur beträchtlich, was zu einer unterschiedlichen Art der Entfaltung der Vinculin-Schwanzdomäne führen könnte: Beispielsweise könnte sich durch die Bindung einer filamentösen Struktur wie F-Aktin an Helix 5 (Abbildung 46 B) die Position des Metavinculin-Einschubs bereits so verändern, dass er nicht die Bindung an die 1. Aktinbindungsstelle in Helix 3 stört (Abbildung 46 C).

Auch die Untersuchungen zur Kompetition saurer Phospholipide und der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne um die Bindung an F-Aktin liefern jedoch keinen weiteren Hinweis über die Natur des inhibitorischen Einflusses des Metavinculin-Einschubs gegenüber sauren Phospholipiden: Eine Aufhebung des inhibitorischen Einflusses bei Bindung an F-Aktin kann sowohl durch eine räumliche Entfernung einer negativen Ladung als auch durch die durch eine Konformationsänderung bewirkte Aufhebung einer strukturellen Inhibition erklärt werden.

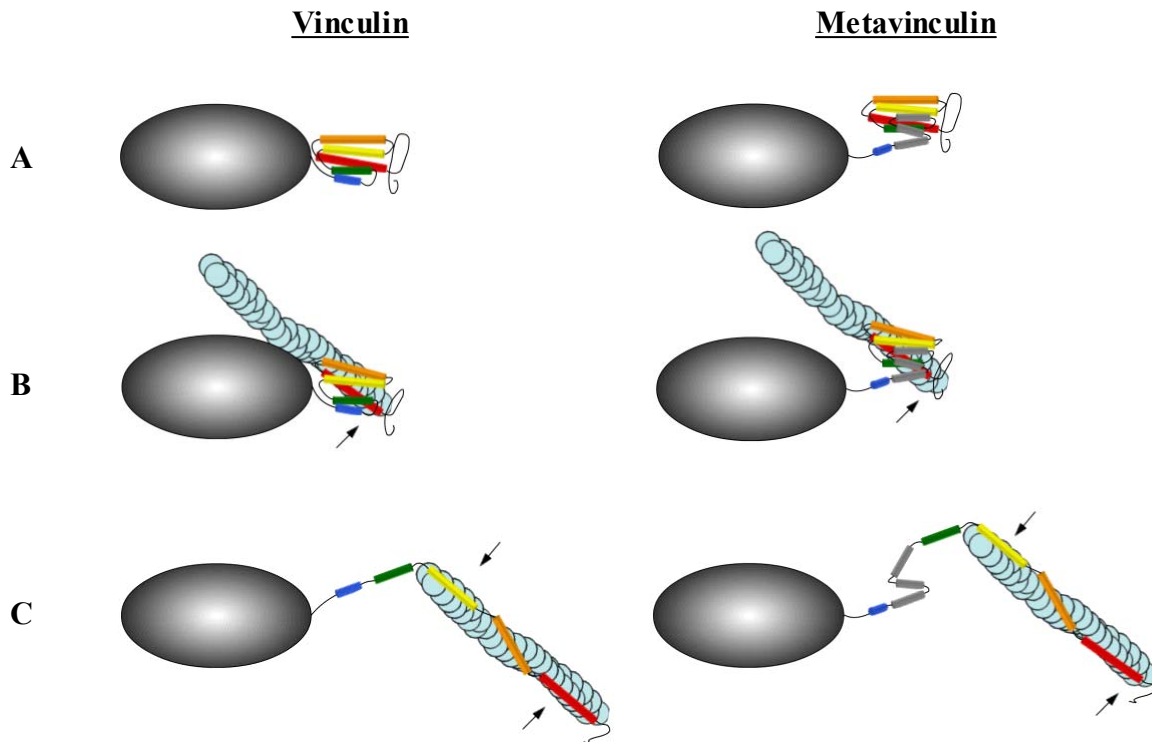


Abbildung 46: Schematische Darstellung eines hypothetischen Modells zur Entfaltung der Vinculin / Metavinculin-Schwanzdomäne durch die Interaktion mit Aktinfilamenten

Die Schwanzdomänen beider Proteine können vermutlich durch die Interaktion mit F-Aktin entfaltet werden, denn die Bindung an F-Aktin ist nahezu identisch. Vermutlich erfolgt die Bindung von Aktinfilamenten an das zuvor geöffnete Protein (A, siehe Kapitel 1.1.5) bevorzugt an der Helix 5 (B, rote Säule, durch Pfeil markiert), denn hier interferiert im Falle der Metavinculin-Schwanzdomäne der saure Metavinculin-Einschub nicht mit der Bindung von Liganden. In einem zweiten Schritt könnte die Bindung der Helix 3 (C, gelbe Säule, durch Pfeil markiert) folgen (Erklärung siehe Text). Darstellung der Vinculin-Kopfdomäne wie in Abb. 4, Schwanzdomäne nach Abb. 3, Aktinfilament stark vereinfacht in hellblau.

4.2.3 Oligomerisierung

Sowohl saure Phospholipide als auch F-Aktin können durch Bindung eine Konformationsänderung der Vinculin-Schwanzdomäne verursachen (Bakolitsa et al., 1999; Johnson & Craig, 2000). Dies bewirkt vermutlich eine Freilegung von Oligomerisierungsbereichen innerhalb der Schwanzdomäne, denn in „chemical crosslinking“-Versuchen ist nach Inkubation mit F-Aktin oder PIP₂ eine starke Oligomerisierung der Vinculin-Schwanzdomäne detektierbar. Da in der vorliegenden Untersuchung deutliche Unterschiede in der Affinität saurer Phospholipide gegenüber der Metavinculin- bzw. Vinculin-Schwanzdomäne zu verzeichnen waren, wurde auch das Dimerisierungsverhalten beider Schwanzdomänen miteinander verglichen. Interessant war das Verhalten der Dimerisierung in direktem Vergleich mit Vinculin (4.2.3.1), aber auch von Metavinculin/Vinculin-Gemischen (4.2.3.2), da nach bisheriger Erkenntnis im lebenden Organismus Metavinculin nicht ohne Vinculin exprimiert wird.

4.2.3.1 Homodimere

Wie durch vergleichende „chemical crosslinking“-Versuche in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, zeigt die Metavinculin-Schwanzdomäne ein gegenüber der Vinculin-Schwanzdomäne signifikant schwächer ausgeprägtes Oligomerisierungsverhalten: Sie dimerisiert schlechter als die Vinculin-Schwanzdomäne und bildet offenbar keine höheren Oligomere (Abbildung 30, 31, 32). Wie bereits für die Bindung saurer Phospholipide diskutiert, ist auch für die Dimerisierung die negative Ladung des Metavinculin-Einschubs von entscheidender Bedeutung. Die Neutralisierung dieser Ladung bewirkt neben der verbesserten Lipidbindung (siehe Kapitel 3.4.1.2.2 und 4.2.2.1) auch eine deutlich verstärkte Oligomerisierung der Metavinculin-Schwanzdomäne in „chemical crosslinking“-Versuchen (Abbildung 33). Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Lipidbindungs- und Oligomerisierungsverhalten der Metavinculin-Schwanzdomäne kann jedoch nicht in Betracht gezogen werden, da die Metavinculin-Schwanzdomäne auch nach Inkubation mit F-Aktin schlechter dimerisiert als die Vinculin-Schwanzdomäne (Abbildung 30, 31). Da beide Proteine offenbar mit ähnlicher Affinität an F-Aktin binden (Abbildung 28), ist die schwächere Dimerisierung der Metavinculin-Schwanzdomäne wahrscheinlich wiederum durch einen inhibitorischen Einfluss des sauren Metavinculin-Einschubs bedingt. Vermutlich bewirkt eine gegenseitige Abstoßung negativ geladener Metavinculin-Einschübe das verschlechterte Dimerisierungsverhalten. Es lässt sich jedoch auch hier nicht ausschließen, dass die Präsenz des Metavinculin-Einschubs auch strukturell mit der Bildung von Homodimeren interferiert.

4.2.3.2 Heterodimere

Im Gegensatz zu der Situation bei der Homooligomerisierung interferiert der Metavinculin-Einschub nicht mit der Bildung von MVT/VT-Heterodimeren. Es ist bekannt, dass die Vinculin-Schwanzdomäne für die Bildung von Homodimeren zuvor eine konformationelle Veränderung durchlaufen muss (Johnson & Craig, 2000). Innerhalb der Vinculin-Schwanzdomäne existieren zwei Bereiche, die miteinander durch die Ausbildung homophiler „coiled-coil“-Interaktionen dimerisieren können (Hüttelmaier et al., 1998; Johnson & Craig, 2000). Es ist nicht bekannt, ob sie darüber hinaus in der Lage sind, heterophile Wechselwirkungen (Abbildung 47) einzugehen. Das Auftreten von MVT/VT-Heterodimeren liefert darauf möglicherweise einen Hinweis, denn im Homodimer (wenngleich noch keine Daten über die Struktur der Metavinculin-Schwanzdomäne vorliegen) kommt es wahrscheinlich eher bei paralleler Anordnung der Metavinculin-Schwanzdomänen zu einer räumlichen Interferenz zweier Metavinculin-Einschübe und so vermutlich zu einer Inhibition der Dimerisierung durch gegenseitige Abstoßung oder strukturelle Effekte. In einem parallel angeordneten MVT/VT-Heterodimer kommt es nicht zu einer Annäherung zweier möglicherweise „sperriger“ Strukturen mit stark negativer Ladung, so dass sich eine Bildung von Heterodimeren erklären lässt.

In antiparalleler Anordnung eines MVT-Homodimers sind die Metavinculin-Einschübe wahrscheinlich weiter voneinander entfernt, so dass eine verglichen mit der Vinculin-Schwanzdomäne schlechtere Homodimerisierung der Metavinculin-Schwanzdomäne schlechter erklärbar wird. Darüber hinaus könnte eine antiparallele Anordnung eines Dimers nicht erklären, warum die Bildung von MVT/MVT Homodimeren beeinträchtigt ist, die Entstehung von MVT/VT-Heterodimeren hingegen gut funktioniert. Eine antiparallele Anordnung bei homotypischer Interaktion der Helices 5 (in Abbildung 47 rechts unten am Beispiel eines MVT/VT-Heterodimers gezeigt) erscheint zwar möglich, doch eher unwahrscheinlich, denn auch in dieser Orientierung lässt sich ein inhibitorischer Einfluss des Metavinculin-Einschubs nicht erklären. Des Weiteren besteht die Aufgabe von Vinculin vermutlich hauptsächlich darin, Aktinfilamente mit Adhäsionskomplexen zu verbinden. Die dafür notwendige Polarität von entsprechenden Bindungsstellen innerhalb des Proteins würde durch eine antiparallele Anordnung zweier Moleküle aufgehoben.

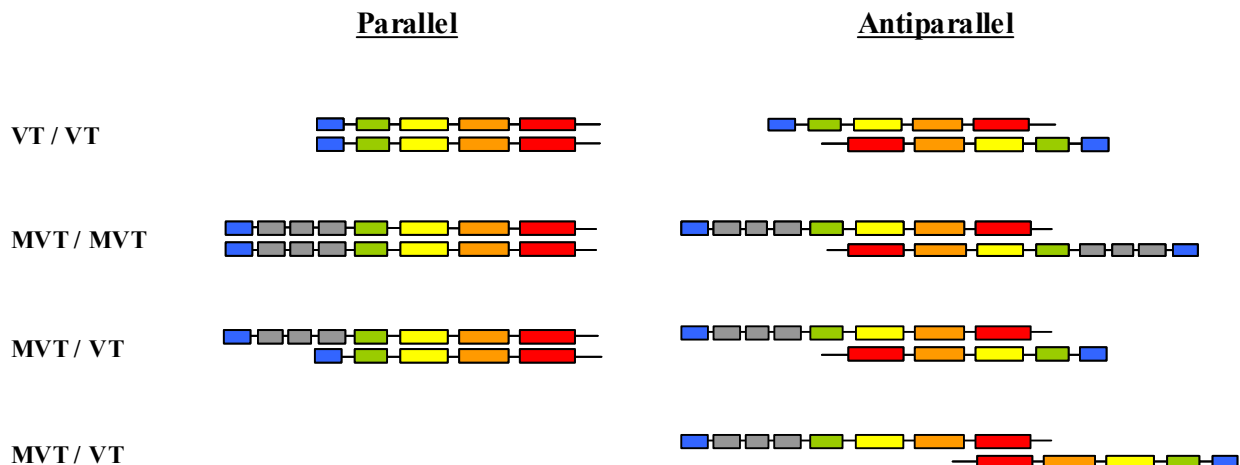


Abbildung 47: Schematische Darstellung von parallel, bzw. antiparallel orientierten Dimeren der Vinculin, bzw. Metavinculin-Schwanzdomäne

Die farbigen Kästen symbolisieren α -helikale Bereiche der Vinculin-Schwanzdomäne (Farbgebung nach Bakolitsa et al., 1999, siehe Abb. 3: blau: Helix 1, grün: Helix 2, gelb: Helix 3, orange: Helix 4, rot: Helix 5) Die grauen Kästen symbolisieren 3 α -helikale Bereiche des Metavinculin-Einschubs (Strukturvoraussage). Die Dimerisierung der Schwanzdomäne erfolgt wahrscheinlich über „coiled-coil“-Interaktionen zwischen den Helices 3 und 5. Ob diese auch heterotypische Interaktionen ausbilden können, ist nicht bekannt. Spekulationen zu diesem Thema finden sich im Text.

Interessanterweise haben bereits geringe Mengen der Metavinculin-Schwanzdomäne einen gravierenden Effekt auf das Oligomerisierungsverhalten der Vinculin-Schwanzdomäne, denn schon bei einem Anteil von nur 10 % sind im „chemical crosslinking“-Versuch keine höheren Oligomere mehr nachweisbar (Abbildung 36). Da die Metavinculin-Schwanzdomäne allein nur schwach dimerisiert und keine höheren Oligomere bildet, ist es denkbar, dass sich die Präsenz der

Metavinculin-Schwanzdomäne auch bei der Heterodimerisierung auswirkt, indem sie die Größe der Oligomerkomplexe reduzierend beeinflusst.

Möglicherweise ist die differentielle Organisation von Aktinfilamenten durch MVT, bzw. VT *in vitro* auf ein unterschiedliches Dimerisierungsverhalten der Schwanzdomänen zurückzuführen: Die durch die Vinculin-Schwanzdomäne induzierten Aktinsuprastrukturen wirken dicker als bei der Metavinculin-Schwanzdomäne. Eventuell ist dies durch die Bündelung von Aktinfilamenten durch die Bindung an große VT-Oligomerkomplexe zu erklären, denn offenbar sind auch Vinculin-Schwanzdimere in der Lage an Aktin zu binden (Johnson & Craig, 2000). Eine Beeinträchtigung der Ausbildung großer Oligomere durch den Metavinculin-Einschub könnte die durch die Metavinculin-Schwanzdomäne *in vitro* induzierten feineren Aktin-Suprastrukturen erklären.

Zwei Interaktionsbereiche innerhalb der Vinculin-Schwanzdomäne können sowohl an F-Aktin binden als auch eine Dimerisierung vermitteln (siehe Kapitel 1.1.5). Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, welche der beiden Bindungsstellen eher die Aktinbindung und welche eher eine Dimerisierung favorisiert. Beide Bindungsstellen sind jedoch für eine Bündelung von Aktinfilamenten notwendig (Hüttelmaier et al., 1997). Es ist nicht auszuschließen, dass in jedem Vinculinmolekül nur eine der beiden Bindungsstellen direkt an Aktinfilamente bindet, während die andere in die Dimerisierung der Schwanzdomäne involviert ist (Hüttelmaier et al., 1997). Die Beeinträchtigung der Oligomerisierung durch den Metavinculin-Einschub ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass im Gegensatz zur Bindung an F-Aktin die Oligomerisierung eher über die α -Helix 3 der Schwanzdomäne als über die Helix 5 erfolgen könnte (vgl. Kapitel 4.2.2.2).

4.3 Metavinculin – Expression und zelluläre Bedeutung

Da sich ein spezifischer „knock out“ von Metavinculin aufgrund einer mit Vinculin gemeinsamen prä-mRNA als sehr kompliziert darstellt, existiert bisher noch keine Metavinculin - „knock out“ Maus. Daher ist es schwierig, zelluläre und organismische Konsequenzen eines Fehlens von Metavinculin abzuschätzen. Hinweise auf die zelluläre Bedeutung des Proteins lassen sich jedoch aus klinischen Untersuchungen gewinnen, in denen ein Fehlen oder eine vererbte Funktionsbeeinträchtigung von Metavinculin in Korrelation mit der Ausbildung von dilatativen Cardiomyopathien beobachtet wurde (Maeda et al., 1997; Olson et al., 2002).

Da eine Diskussion der möglichen Funktion von Metavinculin *in vivo* nur unter genauer Kenntnis der Expression und Lokalisation des Proteins möglich ist, wurden diese Aspekte im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Mäusen detailliert untersucht.

4.3.1 Expressionsnachweis durch spezifische Antikörper

Die für humanes Gewebe beschriebene Assoziation von Metavinculin mit muskulären Adhärenzverbindungen (Belkin et al., 1988a; Glukhova et al., 1986) konnte in der vorliegenden Arbeit auf Gefrierschnitten muskulärer Gewebe der Maus unter Verwendung hochspezifischer Metavinculin-Antikörper bestätigt werden (siehe Kapitel 3.3.3.2).

Da in verschiedenen Untersuchungen divergierende Angaben über die gewebsspezifische Expression von Metavinculin existieren, wurde die gewebsspezifische Expressionscharakteristik des Proteins im Rahmen der vorliegenden Arbeit erneut untersucht. Die Expressionsstärke von Metavinculin wurde in verschiedenen Gewebeextrakten von Mäusen und Ratten durch quantitative Western-Blot-Analysen bezogen auf Vinculin und Aktin bestimmt (siehe Kapitel 3.3.3.1). Nach diesen Untersuchungen wird Metavinculin offenbar in allen untersuchten Muskelgeweben (Glattmuskel, Skelettmuskel, Herzmuskel) exprimiert, wenngleich die Stärke der Expression in den Muskelgeweben deutlich divergiert: Während durch die quantitativen Western-Blot Analysen die für humanes Glattmuskelgewebe bekannten Ergebnisse sowohl bezüglich der Expressionsstärke als auch in Hinblick auf die Lokalisation (Belkin et al., 1988a; Belkin et al., 1988b) bestätigt werden konnten, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die Expression von Metavinculin im murinen Skelettmuskel nachgewiesen. Dies wurde sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch in Western-Blots unter Verwendung verschiedener Antikörper gezeigt. Eine unspezifische Anfärbung muskulärer Adhärenzverbindungen in der Fluoreszenzmikroskopie konnte durch Spezifitätsanalysen der verwendeten α -Metavinculin-Antikörper ausgeschlossen werden (Kapitel 3.3.1). Darüber hinaus ließen sich alle der in dieser Arbeit als Metavinculin-spezifisch beschriebenen Fluoreszenzsignale durch den Einsatz eines die Antikörperbindung blockierenden spezifischen Epitop-Peptids unterdrücken – auch bei Skelettmuskelschnitten. Der Nachweis von Metavinculin in Skelettmuskelgewebe ist nicht völlig überraschend, denn kürzlich wurde gezeigt, dass eine besondere mechanische Beanspruchung auch in schneller Skelettmuskulatur zur Expression von Metavinculin führt (Chopard et al., 2002). Spekulationen zur möglichen Funktion einer durch mechanische Beanspruchung regulierten Expression von Metavinculin finden sich weiter unten in diesem Kapitel.

In Herzmuskelgewebeextrakten von Mäusen und Ratten ist Metavinculin nur sehr schwach vorhanden und zumeist nur bei längerer Exposition der Western-Blots nachweisbar (Abbildung 22). Wenngleich die Expression von Metavinculin im Herzen kontrovers diskutiert wird, ist dies ein Ergebnis, welches insbesondere aufgrund der Verbindung von Metavinculin zur Ausprägung von Cardiomyopathien beim Menschen überrascht (Maeda et al., 1997; Olson et al., 2002). Untersuchungen der Expression anhand der mRNA unterstützen jedoch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zur niedrigen Expression von Metavinculin in Cardiomyocyten von Mäusen (freundliche Mitteilung Manuela Fabienke). Auf Herz-Gefrierschnitten konnte ein deutliches Metavinculin-Signal lediglich in solchen Bereichen verzeichnet werden, die glatte Muskulatur enthielten, nämlich in Blutgefäßwänden.

Möglicherweise lässt sich die mit rund 2,5 % des Gesamtvinculingehalts im Western-Blot ermittelte geringe Expression in Herzen von Mäusen und Ratten auf die Präsenz des Proteins in der glatten Gefäßmuskulatur zurückführen.

Die Expression und Lokalisation von Metavinculin wurde in humanem Gewebe bereits untersucht (Belkin et al., 1988a; Belkin et al., 1988b). Allerdings wurde in diesen Untersuchungen kein echter Metavinculin-spezifischer Antikörper verwendet, sondern ein polyklonales Serum, aus dem per Affinitätschromatographie die Vinculin-bindenden Antikörper eliminiert wurden. Da muskuläre Adhärenzverbindungen oftmals „sticky“ sind, wird leicht eine sarkomere Assoziation suggeriert. Es ist nicht auszuschließen, dass die von Belkin et al. (1988) beschriebene Lokalisation von Metavinculin auf eine unspezifische Bindung von Antikörpern des polyklonalen α -Metavinculinserums an Adhärenzverbindungen zurückzuführen ist.

Andererseits ist es möglich, dass zwischen Menschen und Mäusen, bzw. Ratten Unterschiede in der cardialen Expression von Metavinculin bestehen, denn offenbar wird Metavinculin auch im Herzen des Huhns nur sehr schwach exprimiert (Feramisco et al., 1988). Möglicherweise wird das Protein auch in murinen Herzen so schwach exprimiert, dass ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis in Sarkomeren nicht möglich ist.

4.3.2 Metavinculin und Cardiomyopathien

Die Herstellung eines Kausalzusammenhangs zwischen dem Auftreten von dilatativen Cardiomyopathien beim Menschen und dem Fehlen, bzw. der Mutation von Metavinculin wird erschwert durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelte äußerst schwache Expression des Proteins in Herzen von Mäusen und Ratten (vgl. 3.3.3.1). Allerdings ist wie bereits erwähnt, Metavinculin ein Protein, dessen Expression zumindest in Skelettmuskulatur offenbar in Abhängigkeit von mechanischer Belastung reguliert wird (Chopard et al., 2002). In diesem Sinne ist eine exakte Spezifizierung der Metavinculin-Expression auf bestimmte Muskeltypen unter Umständen nur eingeschränkt möglich, wenn nicht gleichzeitig weitere Aspekte (z.B. die stärkere Beanspruchung bestimmter Muskelpartien, Trainingszustand, Alter) in die Untersuchungen einbezogen werden. In diesem Sinne könnten sich auch die unterschiedlichen Größenverhältnisse zwischen Mensch und Maus, bzw. Ratte auf die mechanische Belastung des Herzmuskels in verschiedener Weise auswirken. Eine biochemische Erklärung für die Entstehung von dilatativer Cardiomyopathie bei Mutation des Metavinculin-Einschubs konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden, denn die mutierten humanen Metavinculin-Schwanzdomänen verhielten sich in allen durchgeführten biochemischen Untersuchungen wie das entsprechende Wildtypprotein. Auch Unterschiede in der Bindungsstärke der mit dilatativen Cardiomyopathien assoziierten Metavinculin-Schwanzdomänen gegenüber Raver1 konnten in dieser Arbeit nicht festgestellt werden, was dagegen spricht, dass die

dilatativen Cardiomyopathien ursächlich auf eine veränderte Interaktion mutierten Metavinculins mit Raver1 zurückzuführen sind (quantitative „Yeast Two-Hybrid“-Analysen, nicht gezeigt). Somit ist Raver1 vermutlich nicht für eine strukturelle Verstärkung der Verbindung des Aktin-Cytoskelettsystems mit Adhärenzverbindungen verantwortlich. Da die dilatativen Cardiomyopathien bei Patienten mit veränderten Metavinculin-Proteinen jedoch erst im Erwachsenenalter auftraten, erscheint es möglich, dass die biochemischen Unterschiede zwischen den Proteinen so fein sind, dass sie sich erst bei jahrelanger Beanspruchung des Muskels bemerkbar machen.

Neben einer Verbindung von der Integrität von Metavinculin zur Ausbildung von dilatativen Cardiomyopathien existieren Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang der Expression von Metavinculin und der Ausbildung arteriosklerotischer Plaques in Blutgefäßen: Durch quantitative Western-Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass histologische Veränderungen während der Ausbildung von Arteriosklerose mit einer signifikanten quantitativen Reduktion der Expression von Metavinculin in Glattmuskulatur cardialer Blutgefäßen einhergehen (Meyer et al., 1994).

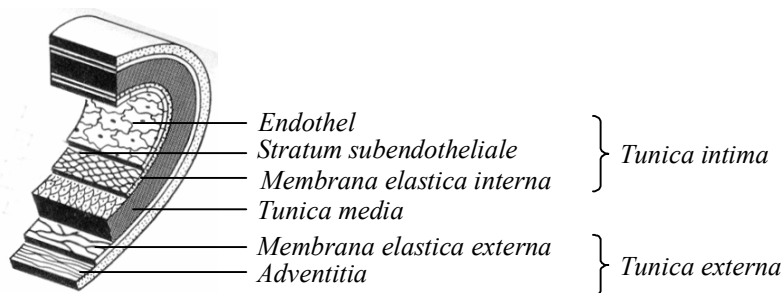


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Wandschichten eines arteriellen Blutgefäßes (entnommen aus: Wehner R. und Gehring W.: *Zoologie*)

Arterielle Blutgefäße bestehen aus drei Schichten: Der *Tunica intima*, der *Tunica media* und der *Tunica externa*. Die *Tunica intima* wiederum ist aus einem einschichtigen Endothel, dem *Stratum subendotheliale* und der *Membrana elastica interna* aufgebaut. Das *Stratum subendotheliale* verfügt über ein feines lockeres Bindegewebe, das gelegentlich glatte Muskelzellen enthält. Die *Tunica media* besteht fast ausschließlich aus glatten Muskelzellen.

Bei Herzkranzgefäßen beginnen arteriosklerotische Veränderungen im allgemeinen im *Stratum subendotheliale* der *Tunica intima* und greifen dann auf die *Tunica media* über (vgl. Abbildung 48). Gerade dies sind die Schichten, die teilweise, bzw. fast ausschließlich aus glatten Muskelzellen bestehen und somit Metavinculin enthalten. Interessanterweise korreliert die Veränderung der Expression von Metavinculin mit der Veränderung der Flexibilität der betroffenen Gefäße während der Ausbildung arteriosklerotischer Plaques (Hirai et al., 1989; Meyer et al., 1994; van Popele et al., 2001).

In diesem Zusammenhang wäre eine Untersuchung der Flexibilitätseigenschaften glatter Muskulatur bei den an dilatativen Cardiomyopathien erkrankten Patienten von besonderem Interesse.

Möglicherweise korreliert der beobachtete Phänotyp im Herzen auch mit einer Veränderung von Flexibilitätseigenschaften glatter Muskulatur.

4.4 Die Funktion von Metavinculin in der Zelle – Modellvorschläge

In diesem Kapitel soll anhand dreier Fragen eine mögliche Funktion von Metavinculin im lebenden Organismus diskutiert werden. Die hier vorgeschlagenen Modelle lehnen sich zwar an die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse an, sind allerdings rein spekulativer Natur. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Funktion von Metavinculin *in vivo* sehr komplex ist, sie erfordert daher weitere Untersuchungen. Einige Vorschläge für eine weiterführende funktionelle Untersuchung von Metavinculin finden sich in Kapitel 4.5.

4.4.1 Welche Auswirkungen hat die Ausbildung von Metavinculin / Vinculin-Heterodimeren?

Der Nachweis von MVT/VT-Heterodimeren liefert einen ersten Hinweis auf eine mögliche direkte strukturelle Interaktion beider Vinculin-Isoformen in Metavinculin-exprimierenden Geweben. Wie in der vorliegenden Untersuchung durch „chemical-crosslinking“-Versuche bei unterschiedlich zusammengesetzten MVT/VT-Gemischen gezeigt werden konnte, wirkt sich bereits die Präsenz geringer Mengen an MVT deutlich auf die Größe von VT-Oligomeren aus. Es ist daher nicht auszuschließen, dass sich die schlechtere Oligomerisierungsfähigkeit von Metavinculin auch *in vivo* in einer Herabsetzung der Größe der Vinculin-Oligomere widerspiegelt (siehe Kapitel 4.5).

Bisher ist noch unklar, welcher Aktinbindungs-/Dimerisierungsbereich innerhalb der Vinculin-Schwanzdomäne eher an Aktin und welcher eher an eine weitere Schwanzdomäne bindet. Wie bereits in Kapitel 4.2.2.2 im Detail erläutert deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aber darauf hin, dass der vordere Bereich eher in Dimerisierungsvorgänge, der hintere eher in Aktinbindung involviert sein könnte. Die Expression von Metavinculin könnte in der Zelle dazu führen, dass das Aktin-Cytoskelett in unterschiedlicher Weise mit modulativ veränderten Zelladhäsionskomplexen verbunden wird (Abbildung 49). Bereits 1998 wurde von Rüdiger et al. vorgeschlagen, dass eine gewebspezifisch unterschiedlich starke Expression von Metavinculin sich modulierend auf die Struktur von Adhäsionskomplexen der betreffenden Gewebe bezüglich ihrer Verschaltung mit dem Aktin-Cytoskelettsystem auswirken könnte.

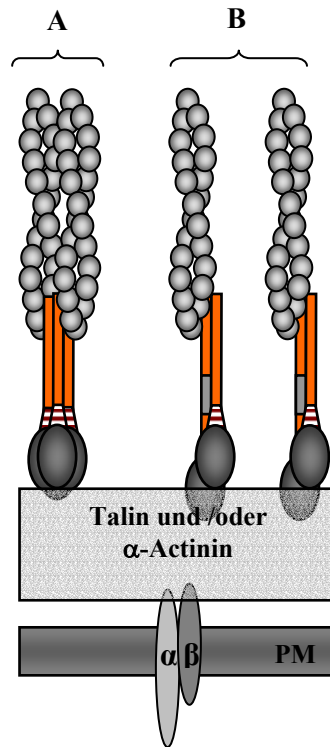


Abbildung 49: Schematische Darstellung hypothetischer Unterschiede in der Verbindung von Aktinfilamenten durch Vinculinoligomere, bzw. Metavinculin / Vinculin-Heterodimere.

A) zeigt die Verbindung von Aktinfilamenten und Adhäsionskomplex durch ein Vinculin-Oligomer, in B) wird die Verbindung durch Metavinculin / Vinculin-Heterodimere hergestellt. Der Vinculin-Kopf ist durch ein dunkelgraues Oval symbolisiert, die Schwanzdomäne ist orange. Der Metavinculin-Einschub ist symbolisch als grauer Kasten innerhalb der Schwanzdomäne dargestellt. PM: Plasmamembran, α , β : Integrin α / β . Das hellgraue Rechteck symbolisiert den Adhäsionskomplex, der die Vinculin-Kopf bindenden Proteine Talin und/oder α -Actinin enthält.

Eine Beeinflussung des Aktin-Cytoskelettsystems ist jedoch auch indirekt über eine modulierte Bindung an F-Aktin-bindende Proteine denkbar: Das Aktin-bindende Protein EVH1-Protein VASP (Vasodilator-stimulated Phosphoprotein) bindet an FP_4 -Motive in der Scharnierregion von Vinculin, aber auch einiger weiterer Proteine wie beispielsweise dem Strukturprotein Zyxin (Reinhard et al., 1995) oder dem Oberflächenprotein ActA aus *Listeria monocytogenes* (Chakraborty et al., 1995). *In vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zeigen, dass die Stärke der Bindung von Ena/VASP-Proteinen in direkter Beziehung zu der Anzahl der FP_4 -Motive innerhalb des Proteins steht (Bubeck et al., 1997; Gertler et al., 1996; Reinhard et al., 1995; Reinhard et al., 1996). In Zusammenhang mit Untersuchungen zur Regulation der VASP-Vinculin-Interaktion wurde bereits vermutet, dass eine Oligomerisierung von Vinculin durch eine Konzentration mehrerer FP_4 -Motive auf engem Raum die Bindung von VASP verstärkt (Hüttelmaier et al., 1998). Eine durch Metavinculin erzeugte schwächere Oligomerisierung könnte sich also auf die Bindung von VASP auswirken. Da es sich bei VASP um ein F-Aktin-bindendes Protein handelt (Reinhard et al., 1992), könnte sich die unterschiedliche Oligomerisierungskapazität von Metavinculin unter Umständen auch indirekt auf das Aktin-

Cytoskelett auswirken. Interessanterweise kann auch VASP über seine C-terminale EVH2-Domäne sowohl an Aktin binden, als auch tetramersieren (Bachmann et al., 1999; Hüttelmaier et al., 1999). Die Tetramerisierung wird hier vermutlich ähnlich wie bei Vinculin über „coiled-coil“-Interaktionen vermittelt. Die F-Aktinbindungs- und Oligomerisierungsbereiche überlappen bei VASP nicht und sind deutlich voneinander entfernt. Die Oligomerisierung von VASP verstärkt die Bindung an Aktin. Es ist denkbar, dass sich ähnlich wie bei VASP auch bei Vinculin die Dimerisierung in einer Verstärkung der Bindung an F-Aktin auswirkt. Eine Verkleinerung der Vinculin-Komplexe durch die Expression von Metavinculin würde sich demnach schwächend auch auf die Bindung an das Cytoskelett auswirken. Da jedoch durch die Expression von Metavinculin keine Bindungsaktivität für F-Aktin verloren geht, ist es unwahrscheinlich, dass innerhalb eines Metavinculin-haltigen Adhäsionsplaques die Verbindung mit dem Aktin-Cytoskelett drastisch geschwächt ist. Es ist denkbar, dass eine verbesserte räumliche Trennung von Aktinbindungsregionen der Vinculin-Schwanzdomäne in einer Verstärkung der Verbindung resultiert (siehe Abbildung 49).

Ursprünglich wurde vermutet, dass die Expression von Metavinculin im Herzen in unbekannter Weise zu einer stärkeren Verbindung des Aktin-Cytoskeletts mit cardialen Zelladhäsionskomplexen führen könnte. Trotz der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen geringen Expression des Proteins in Herzen von Mäusen und Ratten ist diese Hypothese nicht eindeutig von der Hand zu weisen, denn einerseits konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass sich eine geringe Menge Metavinculin möglicherweise gravierend modulativ auf Vinculin/Metavinculin-Komplexe und somit möglicherweise auf die Verbindung des Aktin-Cytoskeletts mit Adhäsionskomplexen auswirken könnte. Andererseits stammen die in dieser Arbeit erbrachten Daten zur gewebsspezifischen Expression von Metavinculin aus Gewebe von Mäusen und Ratten. Wie bereits in Kapitel 4.3.1 diskutiert, könnte sich die Expression in humanem Gewebe unterscheiden.

Neben einer möglichen strukturellen Verstärkung der „Verschaltung“ des Cytoskeletts mit Adhärenzverbindungen deuten histologische Veränderungen während der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques darauf hin, dass die Expression von Metavinculin in unbekannter Weise mit Flexibilitätseigenschaften glatter Muskulatur in Zusammenhang stehen könnte. In direktem Zusammenhang mit Flexibilitätseigenschaften steht die Resistenz glatter Muskulatur gegenüber Dehnungskräften. Interessanterweise wird Metavinculin gerade in solcher Muskulatur stark exprimiert, die im lebenden Organismus großen Dehnungskräften widerstehen muss (z.B. Blase und Uterus). Bereits die besondere Anordnung des kontraktilen Apparates gewährleistet eine besondere Dehnbarkeit glatter Muskulatur. Die Präsenz von Metavinculin könnte jedoch zusätzlich in bisher unbekannter Weise den kontraktilen Apparat gegen Dehnung stabilisieren oder zusätzliche Flexibilität des kontraktilen Apparates bereitstellen. Die Expression von Metavinculin könnte dem Organismus so die Möglichkeit bieten, kontraktile Systeme veränderten Belastungssituationen anzupassen.

4.4.2 Warum wird Metavinculin offenbar nie ohne Vinculin exprimiert?

Nach heutigem Kenntnisstand existieren keine Muskelgewebe, in denen ausschließlich Metavinculin ohne gleichzeitige Expression von Vinculin vorhanden ist. Es stellt sich die Frage, aus welchem Grund dies der Fall ist. Es ist denkbar, dass Metavinculin ohne die gleichzeitige Präsenz von Vinculin nicht effektiv in naszierende oder bereits bestehende Adhärenzverbindungen eingebaut werden kann. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Affinität von Metavinculin gegenüber sauren Phospholipiden deutlich geringer als bei Vinculin. Da saure Phospholipide für die Regulation vieler Proteine des Aktin-Cytoskeletts benötigt werden, ist nicht auszuschließen, dass eine verminderte Affinität von Metavinculin gegenüber sauren Phospholipiden in einer schlechteren Aktivierbarkeit des Proteins resultiert. Die in dieser Arbeit erstmalig gezeigte Bildung von Vinculin / Metavinculin-Heterodimeren über die Assoziation der Schwanzdomänen sowie die schwächere Dimerisierung von Metavinculin-Schwanzdomänen deuten auf eine mögliche koaktivierende Funktion von Vinculin während des Einbaus von Metavinculin in Adhärenzverbindungen hin. Dieser Punkt wird im folgenden Kapitel diskutiert.

Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass sich die Gegenwart von Metavinculin auf die Struktur Aktin-basierter Adhärenzverbindungen so gravierend auswirkt, dass sich bei ausschließlicher Expression des Proteins die Verbindung des Aktin-Cytoskeletts mit Adhärenzverbindungen in einer für Kraftübertragungsmechanismen nicht akzeptablen Weise verschlechtern würde. Wie in Kapitel 4.3.2 bereits in Zusammenhang mit der Expression von Metavinculin im Hinblick auf die Ausprägung von Herzkrankheiten diskutiert, korreliert die Expression von Metavinculin mit einer erhöhten Flexibilität kontraktile Gewebe. Eine ausschließliche Expression des Proteins könnte sich in bisher unbekannter Weise auf eine Beeinträchtigung der Verbindung von Aktinfilamenten mit Adhärenzverbindungen auswirken.

4.4.3 Wie verläuft der Einbau von Metavinculin in Adhärenzverbindungen?

In der Zelle wird die Kopf-Schwanz-Interaktion bei Metavinculin und bei Vinculin vermutlich durch Interaktion mit den Kopfgruppen saurer Membranphospholipide gelöst. Wie in Kapitel 4.2.1 diskutiert, sind offenbar sowohl Vinculin als auch Metavinculin in ähnlicher Weise in der Lage, nach der Lösung der Kopf-Schwanz-Interaktion mit weiteren Liganden zu interagieren. Solch ein Ligand könnte beispielsweise bereits in Adhäsionsplaques vorhandenes Talin sein (Moulder et al., 1996), dessen Interaktion mit Vinculin dieses vermutlich auch nach einer Spaltung saurer Phospholipide durch Phospholipasen geöffnet hält (Bass et al., 2002).

Da die Metavinculin-Schwanzdomäne schlechter als die Vinculin-Schwanzdomäne an saure Phospholipide bindet, ist auch eine im Vergleich zu Vinculin verminderte Entfaltung der

Schwanzdomäne durch Interaktion mit der Lipidmembran denkbar. Dies könnte wiederum interessante Konsequenzen für die Dynamik der Bindung weiterer Liganden der Metavinculin-Schwanzdomäne haben, denn durch eine fehlende oder schlechtere Interaktion der Helix 3 mit der Lipidmembran könnten Ligandenbindungsstellen in diesem Bereich verglichen mit der Vinculin-Schwanzdomäne kurzfristig besser zugänglich sein.

Über den genauen Zeitpunkt der Dimerisierung von Vinculin während der Einbindung in wachsende Adhäsionsstrukturen kann bisher nur spekuliert werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente deuten darauf hin, dass Vinculin dimerisieren kann, sobald die Kopf-Schwanz-Interaktion gelöst und die Schwanzdomäne entfaltet ist. Während des Einbaus in Adhärenzverbindungen ist dies bereits zu einem relativ frühen Zeitpunkt der Fall, nämlich sobald die Vinculin-Schwanzdomäne mit sauren Kopfgruppen von Membranlipiden in Kontakt tritt.

Wie bereits angesprochen, ist die Verankerung von Aktinfilamenten mit Zelladhäsionskomplexen vermutlich die wichtigste Funktion von Vinculin. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Eigenschaft von Metavinculin, die sich vermutlich am deutlichsten auf die Zellmechanik kontraktile Zellen auswirken könnte, eine schwächere Dimerisierung, bzw. eine modulierende Wirkung auf die Größe von Aktin-bindenden Vinculinoligomeren ist. Es stellt sich die Frage, inwieweit auch nach der Etablierung von Adhäsionsverbindungen Metavinculin in diese eingebaut werden kann und so eine Veränderung dieser Strukturen bewirken könnte. Die Inkorporation von Metavinculin in Adhärenzverbindungen könnte auf verschiedene Weise funktionieren:

1. Metavinculin und Vinculin werden immer simultan in neue Adhärenzverbindungen eingebaut. Dabei werden beide Proteine an der Membran geöffnet und durch Assoziation mit einem Kopfliganden (z.B. Talin) offen gehalten. Bereits in diesem Zustand könnte Vinculin als Koaktivator von Metavinculin für die zweite Phase der Aktivierung fungieren, indem es dessen Schwanzdomäne entfalten und mit ihr Heterodimere bilden könnte. Vorstellbar wäre dies insbesondere in Glattmuskeln, in denen annähernd gleiche Mengen an Metavinculin und Vinculin exprimiert werden.
2. Die niedrige Expression in Skelett- aber auch in Herzmuskeln sowie eine Abhängigkeit der Metavinculinexpression von mechanischer Belastung legen ein zweites Modell nahe: Demnach könnte Metavinculin unabhängig von Vinculin in bereits bestehende Adhäsionskomplexe eingebaut werden. Das Lösen der Kopf-Schwanz-Wechselwirkung und die Assoziation mit Kopfliganden verlaufen völlig unabhängig von Vinculin und auch im zweiten Schritt bindet das Protein unabhängig von Vinculin an Aktinfilamente oder aber bereits in Adhäsionskomplexe eingebundenes Vinculin fungiert als Koaktivator.
3. Schließlich sind zwischen beiden Modellvorstellungen auch Übergänge denkbar, da Adhärenzverbindungen wahrscheinlich auch im Muskel einem gewissen „Turnover“ unterliegen.

4.5 Ausblick

Von eminenter Bedeutung für ein Verständnis biochemischer Eigenschaften der Metavinculin-Schwanzdomäne ist die Kenntnis ihrer Struktur. Wahrscheinlich ist der Metavinculin-Einschub zu drei α -helikalen Bereichen gefaltet. Hinweise über die räumliche Anordnung der zusätzlichen α -Helices innerhalb der Vinculin-Schwanzdomäne könnten möglicherweise die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelte modulative Aktivität des Metavinculin-Einschubs auf die Bindung an saure Phospholipide und weitere Metavinculin-Schwanzdomänen erklären. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in einer Kooperation (GBF Braunschweig, AG Prof. Dr. D. Heinz) versucht, die Tertiärstruktur der Metavinculin-Schwanzdomäne aufzuklären. Die Versuche scheiterten jedoch daran, dass sich die Metavinculin-Schwanzdomäne (wahrscheinlich durch zusätzliche Proteaseschnittstellen im Metavinculin-Einschub) *in vitro* wesentlich instabiler verhält als die Vinculin-Schwanzdomäne und sich somit nicht kristallisieren ließ.

Trotz der ausführlichen Charakterisierung biochemischer Eigenschaften von Metavinculin bleiben viele Fragen unbeantwortet. Insbesondere die Auswirkung dieser biochemischen Eigenheiten *in vivo* bedarf weiterer Untersuchungen. So existieren noch keine Daten darüber, inwieweit sich das *in vitro* beobachtete unterschiedliche Dimerisierungsverhalten von Vinculin und Metavinculin tatsächlich *in vivo* auf die Struktur von Adhärenzverbindungen auswirkt. Wichtige Einblicke in die Wirkungsweise von Metavinculin *in vivo* könnten möglicherweise stabil mit GFP-Vinculin oder GFP-Metavinculin transfizierte Vinculin-null Zellen (F9 γ 229) liefern, denn diese Zellen ermöglichen vergleichende Untersuchungen ohne Beeinträchtigung durch endogenes Vinculin. Eine genaue Quantifizierung der zellulären Expression von Metavinculin bzw. Vinculin ist daher möglich und erlaubt die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen möglichen zellulären Unterschieden und der Präsenz, bzw. Expressionsrate von Vinculin oder Metavinculin. Vergleichende videomikroskopische Untersuchungen von GFP-Vinculin und GFP-Metavinculin könnten Hinweise auf die Dynamik der Inkorporation beider Proteine in naszierende Fokalkontakte erbringen. Denkbar wäre auch, dass sich die Morphologie der Adhäsionsverbindungen in den Zellen unterscheidet. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch die Untersuchung einer möglichen differentiellen Organisation des Aktin-Cytoskeletts. Auch zur Überprüfung der These, dass Metavinculin möglicherweise eine Schutz- oder Reparaturfunktion für Adhäsionsverbindungen bei mechanischem Stress übernimmt, könnten vergleichende Untersuchungen von stabil mit Vinculin, bzw. Metavinculin transfizierten Zellen herangezogen werden.

Elektronenmikroskopische Analysen könnten Aufschluss über Unterschiede in der Feinstruktur Metavinculin-freier und Metavinculin-haltiger Adhärenzverbindungen liefern.

Von besonderer Bedeutung könnte die Untersuchung von möglichen histologischen Veränderungen glatter Muskulatur bei der Mutation oder dem Fehlen von Metavinculin sein. Bisherige Versuche

beschränkten sich lediglich auf eine Charakterisierung des Herzmuskels, da sich hier am deutlichsten ein Phänotyp zeigt.

5 Literatur

- Alatortsev, V.E., Kramerova, I.A., Frolov, M.V., Lavrov, S.A., Westphal, E.D.** (1997) Vinculin gene is non-essential in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett*, **413**, 197-201.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.** (1995) *Molekularbiologie der Zelle*. VCH, Weinheim.
- Bachmann, C., Fischer, L., Walter, U., Reinhard, M.** (1999) The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J Biol Chem*, **274**, 23549-23557.
- Bakolitsa, C., de Pereda, J.M., Bagshaw, C.R., Critchley, D.R., Liddington, R.C.** (1999) Crystal structure of the vinculin tail suggests a pathway for activation. *Cell*, **99**, 603-613.
- Barstead, R.J. und Waterston, R.H.** (1991) Vinculin is essential for muscle function in the nematode. *J Cell Biol*, **114**, 715-724.
- Bass, M.D., Patel, B., Barsukov, I.G., Fillingham, I.J., Mason, R., Smith, B.J., Bagshaw, C.R., Critchley, D.R.** (2002) Further characterization of the interaction between the cytoskeletal proteins talin and vinculin. *Biochem J*, **362**, 761-768.
- Bass, M.D., Smith, B.J., Prigent, S.A., Critchley, D.R.** (1999) Talin contains three similar vinculin-binding sites predicted to form an amphipathic helix. *Biochem J*, **341**, 257-263.
- Beck, K.** (1989) Structural model of vinculin: correlation of amino acid sequence with electron-microscopical shape. *FEBS Lett*, **249**, 1-4.
- Belkin, A.M. und Koteliansky, V.E.** (1987) Interaction of iodinated vinculin, metavinculin and alpha-actinin with cytoskeletal proteins. *FEBS Lett*, **220**, 291-294.
- Belkin, A.M., Ornatsky, O.I., Glukhova, M.A., Koteliansky, V.E.** (1988a) Immunolocalization of meta-vinculin in human smooth and cardiac muscles. *J Cell Biol*, **107**, 545-553.
- Belkin, A.M., Ornatsky, O.I., Kabakov, A.E., Glukhova, M.A., Koteliansky, V.E.** (1988b) Diversity of vinculin/meta-vinculin in human tissues and cultivated cells. Expression of muscle specific variants of vinculin in human aorta smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **263**, 6631-6635.
- Bendori, R., Salomon, D., Geiger, B.** (1989) Identification of two distinct functional domains on vinculin involved in its association with focal contacts. *J Cell Biol*, **108**, 2383-2393.
- Birnboim, H.C. und Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.

- Breiter, D.R., Kanost, M.R., Benning, M.M., Wesenberg, G., Law, J.H., Wells, M.A., Rayment, I., Holden, H.M.** (1991) Molecular structure of an apolipoprotein determined at 2.5-Å resolution. *Biochemistry*, **30**, 603-608.
- Brindle, N.P., Holt, M.R., Davies, J.E., Price, C.J., Critchley, D.R.** (1996) The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. *Biochem J*, **318**, 753-757.
- Bubeck, P., Pistor, S., Wehland, J., Jockusch, B.M.** (1997) Ligand recruitment by vinculin domains in transfected cells. *J Cell Sci*, **110**, 1361-1371.
- Burn, P. und Burger, M.M.** (1987) The cytoskeletal protein vinculin contains transformation-sensitive, covalently bound lipid. *Science*, **235**, 476-479.
- Burridge, K. und Feramisco, J.R.** (1980) Microinjection and localization of a 130K protein in living fibroblasts: a relationship to actin and fibronectin. *Cell*, **19**, 587-595.
- Burridge, K. und Mangeat, P.** (1984) An interaction between vinculin and talin. *Nature*, **308**, 744-746.
- Byrne, B.J., Kaczorowski, Y.J., Coutu, M.D., Craig, S.W.** (1992) Chicken vinculin and meta-vinculin are derived from a single gene by alternative splicing of a 207-base pair exon unique to meta-vinculin. *J Biol Chem*, **267**, 12845-12850.
- Chakraborty, T., Ebel, F., Domann, E., Niebuhr, K., Gerstel, B., Pistor, S., Temm-Grove, C.J., Jockusch, B.M., Reinhard, M., Walter, U., et al.** (1995) A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *Embo J*, **14**, 1314-1321.
- Chaudhary, A., Chen, J., Gu, Q.M., Witke, W., Kwiatkowski, D.J., Prestwich, G.D.** (1998) Probing the phosphoinositide 4,5-bisphosphate binding site of human profilin I. *Chem Biol*, **5**, 273-281.
- Chopard, A., Pons, F., Marini, J.F.** (2002) Vinculin and meta-vinculin in fast and slow rat skeletal muscle before and after hindlimb suspension. *Pflugers Arch*, **444**, 627-633.
- Coll, J.L., Ben-Ze'ev, A., Ezzell, R.M., Rodriguez Fernandez, J.L., Baribault, H., Oshima, R.G., Adamson, E.D.** (1995) Targeted disruption of vinculin genes in F9 and embryonic stem cells changes cell morphology, adhesion, and locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9161-9165.
- Coutu, M.D. und Craig, S.W.** (1988) cDNA-derived sequence of chicken embryo vinculin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8535-8539.
- DeMali, K.A., Barlow, C.A., Burridge, K.** (2002) Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol*, **159**, 881-891.
- Endo, T. und Masaki, T.** (1982) Vinculin isolated from striated muscles, brain, and embryonic smooth muscle of chicken. *Biochem Biophys Res Commun*, **107**, 1467-1474.

- Ezzell, R.M., Goldmann, W.H., Wang, N., Parasharama, N., Ingber, D.E.** (1997) Vinculin promotes cell spreading by mechanically coupling integrins to the cytoskeleton. *Exp Cell Res*, **231**, 14-26.
- Feramisco, J.R. und Burridge, K.** (1980) A rapid purification of alpha-actinin, filamin, and a 130,000-dalton protein from smooth muscle. *J Biol Chem*, **255**, 1194-1199.
- Feramisco, J.R., Smart, J.E., Burridge, K., Helfman, D.M., Thomas, G.P.** (1982) Co-existence of vinculin and a vinculin-like protein of higher molecular weight in smooth muscle. *J Biol Chem*, **257**, 11024-11031.
- Fukami, K., Endo, T., Imamura, M., Takenawa, T.** (1994) alpha-Actinin and vinculin are PIP2-binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase. *J Biol Chem*, **269**, 1518-1522.
- Fukami, K., Furuhashi, K., Inagaki, M., Endo, T., Hatano, S., Takenawa, T.** (1992) Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. *Nature*, **359**, 150-152.
- Fukami, K., Sawada, N., Endo, T., Takenawa, T.** (1996) Identification of a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding site in chicken skeletal muscle alpha-actinin. *J Biol Chem*, **271**, 2646-2650.
- Geiger, B.** (1979) A 130K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell*, **18**, 193-205.
- Geiger, B., Avnur, Z., Rinnerthaler, G., Hinssen, H., Small, V.J.** (1984) Microfilament-organizing centers in areas of cell contact: cytoskeletal interactions during cell attachment and locomotion. *J Cell Biol*, **99**, 83s-91s.
- Geiger, B., Dutton, A.H., Tokuyasu, K.T., Singer, S.J.** (1981) Immunoelectron microscope studies of membrane-microfilament interactions: distributions of alpha-actinin, tropomyosin, and vinculin in intestinal epithelial brush border and chicken gizzard smooth muscle cells. *J Cell Biol*, **91**, 614-628.
- Geiger, B., Tokuyasu, K.T., Dutton, A.H., Singer, S.J.** (1980) Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 4127-4131.
- Gertler, F.B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J., Soriano, P.** (1996) Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*, **87**, 227-239.
- Giehl, K., Valenta, R., Rothkegel, M., Ronsiek, M., Mannherz, H.G., Jockusch, B.M.** (1994) Interaction of plant profilin with mammalian actin. *Eur J Biochem*, **226**, 681-689.
- Gilmore, A.P. und Burridge, K.** (1996) Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature*, **381**, 531-535.
- Gilmore, A.P., Jackson, P., Waites, G.T., Critchley, D.R.** (1992) Further characterisation of the talin-binding site in the cytoskeletal protein vinculin. *J Cell Sci*, **103**, 719-731.

- Gilmore, A.P., Wood, C., Ohanian, V., Jackson, P., Patel, B., Rees, D.J., Hynes, R.O., Critchley, D.R.** (1993) The cytoskeletal protein talin contains at least two distinct vinculin binding domains. *J Cell Biol*, **122**, 337-347.
- Gimona, M., Small, J.V., Moeremans, M., Van Damme, J., Puype, M., Vandekerckhove, J.** (1988) Porcine vinculin and metavinculin differ by a 68-residue insert located close to the carboxy-terminal part of the molecule. *Embo J*, **7**, 2329-2334.
- Glukhova, M.A., Kabakov, A.E., Belkin, A.M., Frid, M.G., Ornatsky, O.I., Zhidkova, N.I., Koteliansky, V.E.** (1986) Meta-vinculin distribution in adult human tissues and cultured cells. *FEBS Lett*, **207**, 139-141.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J.** (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816.
- Heise, H., Bayerl, T., Isenberg, G., Sackmann, E.** (1991) Human platelet P-235, a talin-like actin binding protein, binds selectively to mixed lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*, **1061**, 121-131.
- Hirai, T., Sasayama, S., Kawasaki, T., Yagi, S.** (1989) Stiffness of systemic arteries in patients with myocardial infarction. A noninvasive method to predict severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*, **80**, 78-86.
- Horvath, A.R., Asijee, G.M., Muszbek, L.** (1992) Cytoskeletal assembly and vinculin-cytoskeleton interaction in different phases of the activation of bovine platelets. *Cell Motil Cytoskeleton*, **21**, 123-131.
- Huttelmaier, S., Bubeck, P., Rudiger, M., Jockusch, B.M.** (1997) Characterization of two F-actin-binding and oligomerization sites in the cell-contact protein vinculin. *Eur J Biochem*, **247**, 1136-1142.
- Huttelmaier, S., Harbeck, B., Steffens, O., Messerschmidt, T., Illenberger, S., Jockusch, B.M.** (1999) Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Lett*, **451**, 68-74.
- Huttelmaier, S., Illenberger, S., Grosheva, I., Rudiger, M., Singer, R.H., Jockusch, B.M.** (2001) Raver1, a dual compartment protein, is a ligand for PTB/hnRNPI and microfilament attachment proteins. *J Cell Biol*, **155**, 775-786.
- Huttelmaier, S., Mayboroda, O., Harbeck, B., Jarchau, T., Jockusch, B.M., Rudiger, M.** (1998) The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr Biol*, **8**, 479-488.
- Isenberg, G. und Niggli, V.** (1998) Interaction of cytoskeletal proteins with membrane lipids. *Int Rev Cytol*, **178**, 73-125.
- Ito, S., Werth, D.K., Richert, N.D., Pastan, I.** (1983) Vinculin phosphorylation by the src kinase. Interaction of vinculin with phospholipid vesicles. *J Biol Chem*, **258**, 14626-14631.

- James, P., Halladay, J., Craig, E.A.** (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-1436.
- Jockusch, B.M. und Isenberg, G.** (1981) Interaction of alpha-actinin and vinculin with actin: opposite effects on filament network formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 3005-3009.
- Jockusch, B.M. und Isenberg, G.** (1982) Vinculin and alpha-actinin: interaction with actin and effect on microfilament network formation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **46 Pt 2**, 613-623.
- Johnson, R.P. und Craig, S.W.** (1994) An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *J Biol Chem*, **269**, 12611-12619.
- Johnson, R.P. und Craig, S.W.** (1995a) The carboxy-terminal tail domain of vinculin contains a cryptic binding site for acidic phospholipids. *Biochem Biophys Res Commun*, **210**, 159-164.
- Johnson, R.P. und Craig, S.W.** (1995b) F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains [see comments]. *Nature*, **373**, 261-264.
- Johnson, R.P. und Craig, S.W.** (2000) Actin activates a cryptic dimerization potential of the vinculin tail domain. *J Biol Chem*, **275**, 95-105.
- Johnson, R.P., Niggli, V., Durrer, P., Craig, S.W.** (1998) A conserved motif in the tail domain of vinculin mediates association with and insertion into acidic phospholipid bilayers. *Biochemistry*, **37**, 10211-10222.
- Jones, P., Jackson, P., Price, G.J., Patel, B., Ohanion, V., Lear, A.L., Critchley, D.R.** (1989) Identification of a talin binding site in the cytoskeletal protein vinculin. *J Cell Biol*, **109**, 2917-2927.
- Kawabe, H., Hata, Y., Takeuchi, M., Ide, N., Mizoguchi, A., Takai, Y.** (1999) nArgBP2, a novel neural member of ponsin/ArgBP2/vinexin family that interacts with synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95-associated protein (SAPAP). *J Biol Chem*, **274**, 30914-30918.
- Kioka, N., Sakata, S., Kawauchi, T., Amachi, T., Akiyama, S.K., Okazaki, K., Yaen, C., Yamada, K.M., Aota, S.** (1999) Vinexin: a novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization. *J Cell Biol*, **144**, 59-69.
- Korneeva, N.L. und Jockusch, B.M.** (1996) Light microscopic analysis of ligand-induced actin filament suprastructures. *Eur J Cell Biol*, **71**, 351-355.
- Kotliansky, V.E. und Gneushev, G.N.** (1983) Vinculin localization in cardiac muscle. *FEBS Lett*, **159**, 158-160.
- Kotliansky, V.E., Gneushev, G.N., Glukhova, M.A., Venyaminov, S.Y., Muszbek, L.** (1984) Identification and isolation of vinculin from platelets. *FEBS Lett*, **165**, 26-30.
- Kotliansky, V.E., Ogryzko, E.P., Zhidkova, N.I., Weller, P.A., Critchley, D.R., Vancompernelle, K., Vandekerckhove, J., Strasser, P., Way, M., Gimona, M., et al.** (1992) An additional exon in the human vinculin gene specifically encodes meta-vinculin-specific difference

- peptide. Cross-species comparison reveals variable and conserved motifs in the meta-vinculin insert. *Eur J Biochem*, **205**, 1218.
- Kroemker, M., Rudiger, A.H., Jockusch, B.M., Rudiger, M.** (1994) Intramolecular interactions in vinculin control alpha-actinin binding to the vinculin head. *FEBS Lett*, **355**, 259-262.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lassing, I. und Lindberg, U.** (1985) Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature*, **314**, 472-474.
- Lee, S. und Otto, J.J.** (1997) Vinculin and talin: kinetics of entry and exit from the cytoskeletal pool. *Cell Motil Cytoskeleton*, **36**, 101-111.
- Lehto, V.P. und Virtanen, I.** (1985) Vinculin in cultured bovine lens-forming cells. *Cell Differ*, **16**, 153-160.
- Lu, B., Morrow, J.A., Weisgraber, K.H.** (2000) Conformational reorganization of the four-helix bundle of human apolipoprotein E in binding to phospholipid. *J Biol Chem*, **275**, 20775-20781.
- Maeda, M., Holder, E., Lowes, B., Valent, S., Bies, R.D.** (1997) Dilated cardiomyopathy associated with deficiency of the cytoskeletal protein metavinculin. *Circulation*, **95**, 17-20.
- Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Takahashi, K., Satoh, K., Nishioka, H., Mizoguchi, A., Takai, Y.** (1999) Ponsin/SH3P12: an I-afadin- and vinculin-binding protein localized at cell-cell and cell-matrix adherens junctions. *J Cell Biol*, **144**, 1001-1017.
- Marchisio, P.C., Bergui, L., Corbascio, G.C., Cremona, O., D'Urso, N., Schena, M., Tesio, L., Caligaris-Cappio, F.** (1988) Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. *Blood*, **72**, 830-833.
- Massa, R., Silvestri, G., Sancesario, G., Bernardi, G.** (1995) Immunocytochemical localization of vinculin in muscle and nerve. *Muscle Nerve*, **18**, 1277-1284.
- Menkel, A.R., Kroemker, M., Bubeck, P., Ronsiek, M., Nikolai, G., Jockusch, B.M.** (1994) Characterization of an F-actin-binding domain in the cytoskeletal protein vinculin. *J Cell Biol*, **126**, 1231-1240.
- Meyer, T., Brink, U., Unterberg, C., Stohr, S., Kreuzer, H., Buchwald, A.B.** (1994) Expression of meta-vinculin in human coronary arteriosclerosis is related to the histological grade of plaque formation. *Atherosclerosis*, **111**, 111-119.
- Milam, L.M.** (1985) Electron microscopy of rotary shadowed vinculin and vinculin complexes. *J Mol Biol*, **184**, 543-545.
- Miller, G.J., Dunn, S.D., Ball, E.H.** (2001) Interaction of the N- and C-terminal domains of vinculin. Characterization and mapping studies. *J Biol Chem*, **276**, 11729-11734.

- Misra, S. und Hurley, J.H.** (1999) Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell*, **97**, 657-666.
- Moiseyeva, E.P., Weller, P.A., Zhidkova, N.I., Corben, E.B., Patel, B., Jasinska, I., Koteliensky, V.E., Critchley, D.R.** (1993) Organization of the human gene encoding the cytoskeletal protein vinculin and the sequence of the vinculin promoter. *J Biol Chem*, **268**, 4318-4325.
- Molony, L. und Burridge, K.** (1985) Molecular shape and self-association of vinculin and metavinculin. *J Cell Biochem*, **29**, 31-36.
- Moulder, G.L., Huang, M.M., Waterston, R.H., Barstead, R.J.** (1996) Talin requires beta-integrin, but not vinculin, for its assembly into focal adhesion-like structures in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*, **7**, 1181-1193.
- Mulligan, L.M., Gardner, E., Telenius, H., Ponder, B.A.** (1992) Complementary physical and genetic techniques map the vinculin (VCL) gene on chromosome 10q. *Genomics*, **13**, 1347-1349.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- Niggli, V., Dimitrov, D.P., Brunner, J., Burger, M.M.** (1986) Interaction of the cytoskeletal component vinculin with bilayer structures analyzed with a photoactivatable phospholipid. *J Biol Chem*, **261**, 6912-6918.
- Noda, S. und Mitsui, T.** (1993) Distribution of vinculin in the duodenum of chick embryos: immunohistochemical studies at the light and electron microscopic level. *Okajimas Folia Anat Jpn*, **70**, 51-57.
- Olson, T.M., Illenberger, S., Kishimoto, N.Y., Huttelmaier, S., Keating, M.T., Jockusch, B.M.** (2002) Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, **105**, 431-437.
- Otto, J.J.** (1983) Detection of vinculin-binding proteins with an ¹²⁵I-vinculin gel overlay technique. *J Cell Biol*, **97**, 1283-1287.
- Otto, J.J.** (1986) The lack of interaction between vinculin and actin. *Cell Motil Cytoskeleton*, **6**, 48-55.
- Pardo, J.V., Siliciano, J.D., Craig, S.W.** (1983a) Vinculin is a component of an extensive network of myofibril-sarcolemma attachment regions in cardiac muscle fibers. *J Cell Biol*, **97**, 1081-1088.
- Pardo, J.V., Siliciano, J.D., Craig, S.W.** (1983b) A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 1008-1012.
- Price, G.J., Jones, P., Davison, M.D., Patel, B., Bendori, R., Geiger, B., Critchley, D.R.** (1989) Primary sequence and domain structure of chicken vinculin. *Biochem J*, **259**, 453-461.

- Raussens, V., Fisher, C.A., Goormaghtigh, E., Ryan, R.O., Ruyschaert, J.M.** (1998) The low density lipoprotein receptor active conformation of apolipoprotein E. Helix organization in n-terminal domain-phospholipid disc particles. *J Biol Chem*, **273**, 25825-25830.
- Raz, A. und Geiger, B.** (1982) Altered organization of cell-substrate contacts and membrane-associated cytoskeleton in tumor cell variants exhibiting different metastatic capabilities. *Cancer Res*, **42**, 5183-5190.
- Raz, A., Zoller, M., Ben, Z.e.** (1986) Cell configuration and adhesive properties of metastasizing and non-metastasizing BSp73 rat adenocarcinoma cells. *Exp Cell Res*, **162**, 127-141.
- Reinhard, M., Halbrugge, M., Scheer, U., Wiegand, C., Jockusch, B.M., Walter, U.** (1992) The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *Embo J*, **11**, 2063-2070.
- Reinhard, M., Jouvenal, K., Tripiet, D., Walter, U.** (1995) Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7956-7960.
- Reinhard, M., Rudiger, M., Jockusch, B.M., Walter, U.** (1996) VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett*, **399**, 103-107.
- Rodriguez Fernandez, J.L., Geiger, B., Salomon, D., Ben-Ze'ev, A.** (1992) Overexpression of vinculin suppresses cell motility in BALB/c 3T3 cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **22**, 127-134.
- Rodriguez Fernandez, J.L., Geiger, B., Salomon, D., Ben-Ze'ev, A.** (1993) Suppression of vinculin expression by antisense transfection confers changes in cell morphology, motility, and anchorage-dependent growth of 3T3 cells. *J Cell Biol*, **122**, 1285-1294.
- Rosenfeld, G.C., Hou, D.C., Dingus, J., Meza, I., Bryan, J.** (1985) Isolation and partial characterization of human platelet vinculin. *J Cell Biol*, **100**, 669-676.
- Rudiger, M., Jockusch, B.M., Rothkegel, M.** (1997) Epitope tag-antibody combination useful for the detection of protein expression in prokaryotic and eukaryotic cells. *Biotechniques*, **23**, 96-97.
- Rudiger, M., Korneeva, N., Schwienbacher, C., Weiss, E.E., Jockusch, B.M.** (1998) Differential actin organization by vinculin isoforms: implications for cell type-specific microfilament anchorage. *FEBS Lett*, **431**, 49-54.
- Samuels, M., Ezzell, R.M., Cardozo, T.J., Critchley, D.R., Coll, J.L., Adamson, E.D.** (1993) Expression of chicken vinculin complements the adhesion-defective phenotype of a mutant mouse F9 embryonal carcinoma cell. *J Cell Biol*, **121**, 909-921.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Schwienbacher, C., Jockusch, B.M., Rudiger, M.** (1996) Intramolecular interactions regulate serine/threonine phosphorylation of vinculin. *FEBS Lett*, **384**, 71-74.

- Sechi, A.S. und Wehland, J.** (2000) The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci*, **113 Pt 21**, 3685-3695.
- Seidman, J.G. und Seidman, C.** (2001) The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*, **104**, 557-567.
- Shear, C.R. und Bloch, R.J.** (1985) Vinculin in subsarcolemmal densities in chicken skeletal muscle: localization and relationship to intracellular and extracellular structures. *J Cell Biol*, **101**, 240-256.
- Sigal, C.T., Zhou, W., Buser, C.A., McLaughlin, S., Resh, M.D.** (1994) Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12253-12257.
- Siliciano, J.D. und Craig, S.W.** (1982) Meta-vinculin--a vinculin-related protein with solubility properties of a membrane protein. *Nature*, **300**, 533-535.
- Siliciano, J.D. und Craig, S.W.** (1987) Properties of smooth muscle meta-vinculin. *J Cell Biol*, **104**, 473-482.
- Small, J.V.** (1985) Geometry of actin-membrane attachments in the smooth muscle cell: the localisations of vinculin and alpha-actinin. *Embo J*, **4**, 45-49.
- Small, J.V. und Gimona, M.** (1998) The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell. *Acta Physiol Scand*, **164**, 341-348.
- Sohn, R.H., Chen, J., Koblan, K.S., Bray, P.F., Goldschmidt-Clermont, P.J.** (1995) Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human profilin. *J Biol Chem*, **270**, 21114-21120.
- Spudich, J.A. und Watt, S.** (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem*, **246**, 4866-4871.
- Steimle, P.A., Hoffert, J.D., Adey, N.B., Craig, S.W.** (1999) Polyphosphoinositides inhibit the interaction of vinculin with actin filaments. *J Biol Chem*, **274**, 18414-18420.
- Strasser, P., Gimona, M., Herzog, M., Geiger, B., Small, J.V.** (1993) Variable and constant regions in the C-terminus of vinculin and metavinculin. Cloning and expression of fragments in *E. coli*. *FEBS Lett*, **317**, 189-194.
- Strickland, S. und Mahdavi, V.** (1978) The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell*, **15**, 393-403.
- Tempel, M., Goldmann, W.H., Isenberg, G., Sackmann, E.** (1995) Interaction of the 47-kDa talin fragment and the 32-kDa vinculin fragment with acidic phospholipids: a computer analysis. *Biophys J*, **69**, 228-241.

- Turner, C.E., Glenney, J.R., Jr.,Burridge, K.** (1990) Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J Cell Biol*, **111**, 1059-1068.
- van Popele, N.M., Grobbee, D.E., Bots, M.L., Asmar, R., Topouchian, J., Reneman, R.S., Hoeks, A.P., van der Kuip, D.A., Hofman, A.,Witteveen, J.C.** (2001) Association between arterial stiffness and atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Stroke*, **32**, 454-460.
- Villarejo, M.R. und Zabin, I.** (1974) Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J Bacteriol*, **120**, 466-474.
- Volberg, T., Geiger, B., Kam, Z., Pankov, R., Simcha, I., Sabanay, H., Coll, J.L., Adamson, E.,Ben-Ze'ev, A.** (1995) Focal adhesion formation by F9 embryonal carcinoma cells after vinculin gene disruption. *J Cell Sci*, **108**, 2253-2260.
- Wachsstock, D.H., Wilkins, J.A.,Lin, S.** (1987) Specific interaction of vinculin with alpha-actinin. *Biochem Biophys Res Commun*, **146**, 554-560.
- Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E.D.,Takeichi, M.** (1998) alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J Cell Biol*, **142**, 847-857.
- Weekes, J., Barry, S.T.,Critchley, D.R.** (1996) Acidic phospholipids inhibit the intramolecular association between the N- and C-terminal regions of vinculin, exposing actin-binding and protein kinase C phosphorylation sites. *Biochem J*, **314**, 827-832.
- Wehner, R. und Gehring, W.** (1995) *Zoologie*. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Weiss, E.E., Kroemker, M., Rudiger, A.H., Jockusch, B.M.,Rudiger, M.** (1998) Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J Cell Biol*, **141**, 755-764.
- Weller, P.A., Ogryzko, E.P., Corben, E.B., Zhidkova, N.I., Patel, B., Price, G.J., Spurr, N.K., Koteliensky, V.E.,Critchley, D.R.** (1990) Complete sequence of human vinculin and assignment of the gene to chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5667-5671.
- Wiedemann, P., Giehl, K., Almo, S.C., Fedorov, A.A., Girvin, M., Steinberger, P., Rudiger, M., Ortner, M., Sippl, M., Dolecek, C., Kraft, D., Jockusch, B.,Valenta, R.** (1996) Molecular and structural analysis of a continuous birch profilin epitope defined by a monoclonal antibody. *J Biol Chem*, **271**, 29915-29921.
- Wilkins, J.A. und Lin, S.** (1982) High-affinity interaction of vinculin with actin filaments in vitro. *Cell*, **28**, 83-90.
- Wilkins, J.A. und Lin, S.** (1986) A re-examination of the interaction of vinculin with actin. *J Cell Biol*, **102**, 1085-1092.
- Wilson, C., Wardell, M.R., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W.,Agard, D.A.** (1991) Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science*, **252**, 1817-1822.

- Winkler, J., Lunsdorf, H., Jockusch, B.M.** (1996) The ultrastructure of chicken gizzard vinculin as visualized by high-resolution electron microscopy. *J Struct Biol*, **116**, 270-277.
- Wood, C.K., Turner, C.E., Jackson, P., Critchley, D.R.** (1994) Characterisation of the paxillin-binding site and the C-terminal focal adhesion targeting sequence in vinculin. *J Cell Sci*, **107**, 709-717.
- Xu, W., Baribault, H., Adamson, E.D.** (1998b) Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development*, **125**, 327-337.
- Xu, W., Coll, J.L., Adamson, E.D.** (1998a) Rescue of the mutant phenotype by reexpression of full-length vinculin in null F9 cells; effects on cell locomotion by domain deleted vinculin. *J Cell Sci*, **111**, 1535-1544.
- Yaffe, D. und Saxel, O.** (1977) A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation*, **7**, 159-166.
- Yamada, K.M. und Geiger, B.** (1997) Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 76-85.
- Yorifuji, H. und Hirokawa, N.** (1989) Cytoskeletal architecture of neuromuscular junction: localization of vinculin. *J Electron Microsc Tech*, **12**, 160-171.
- Yoshimura, N., Yamakawa, R., Shirakawa, H., Ogino, N., Matsumura, M., Okada, M., Tsukahara, I.** (1986) [Vinculin and actin in cultured chick retinal pigment epithelial cells]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, **90**, 647-652.
- Ziegler, W.H., Tigges, U., Zieseniss, A., Jockusch, B.M.** (2002) A lipid-regulated docking site on vinculin for protein kinase C. *J Biol Chem*, **277**, 7396-7404.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Der Aufbau von Adhäsionsverbindungen (entnommen aus: Alberts et al.: <i>Molekularbiologie der Zelle</i>)	1
Abbildung 2:	Schematische Darstellung verschiedener Konformationen von Vinculin nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen (aus Winkler et al., 1996)	4
Abbildung 3:	Kristallstruktur der Vinculin-Schwanzdomäne (AS 885-1066; entnommen aus Bakolitsa et al., 1999).....	5
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des entfalteten Vinculin-Moleküls und Zuordnung von Liganden zu drei Bereichen des Proteins.....	7
Abbildung 5:	Die Schwächung der Kopf-Schwanz-Interaktion durch Bindung saurer Phospholipide	8
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der vermuteten PIP ₂ -induzierten Konformationsänderung der Vinculin-Schwanzdomäne.....	10
Abbildung 7:	Interaktionsbereiche der Vinculin-Schwanzdomäne, die die Bindung an Aktin und saure Phospholipide sowie die Dimerisierung vermitteln.....	11
Abbildung 8:	Hypothetisches und stark vereinfachtes Modell der Vinculin-Aktivierung bei dem Aufbau von Adhärenzverbindungen (modifiziert nach Bakolitsa et al., 1999 und Johnson & Craig, 2000).....	12
Abbildung 9:	Schematische Darstellung der Position des Metavinculin-Einschubs in der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne	14
Abbildung 10:	Schematische Darstellung der Position dreier Mutationen innerhalb des Metavinculin-Einschubs, die mit dem Auftreten von dilatativer Cardiomyopathie korrelieren.....	17
Abbildung 11:	Vermutete Auswirkung der Mutation Metavinculins auf die Morphologie des Herzens, bzw. der Herzmuskelzellen und die Organisation von Aktinfilamenten	18
Abbildung 12:	Schematische Darstellung der verwendeten (M)VT Expressionskonstrukte	54
Abbildung 13:	„Helical Wheel“ – Darstellung der vorausgesagten α -Helix 2 des Metavinculin-Einschubs.	54
Abbildung 14:	Aminosäuresequenz des wt-Metavinculin-Einschubs im Vergleich mit zwei durch Mutagenese erzeugten Aminosäuresequenzen (MVT-NNQ ₈₅₈₋₁₀₆₆ , MVT-QNQ ₈₅₈₋₁₀₆₆).....	55
Abbildung 15:	Gelelektrophoretische Auftrennung aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten und/oder verwendeten Proteine	57
Abbildung 16:	Vergleichende CD-Spektren der für biochemische Untersuchungen eingesetzten (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne	58
Abbildung 17:	Schematische Darstellung einer mit dem „Yeast Two-Hybrid“ System bestätigten intramolekularen Wechselwirkung innerhalb der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne	60
Abbildung 18:	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Epitopkartierung Metavinculin-spezifischer Antikörper.....	61
Abbildung 19:	Spezifitätsnachweis der verwendeten α -Metavinculin-Antikörper im ELISA (exemplarisch für den α -MVI-Peptidantikörper 6E3)	63
Abbildung 20:	Spezifitätsnachweis des α -Metavinculin-Antikörpers 6E3 in mit pEGFP-C2-(Meta)Vinculin transfizierten C2C12-Zellen	65
Abbildung 21:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mit pEGFP-C2-Metavinculin transfizierten C2C12-Zellen	66

Abbildung 22:	Quantifizierung der Expression von Metavinculin bezogen auf den Akttingehalt in verschiedenen Muskelgeweben	67
Abbildung 23:	Schematische Darstellung der cytoskelettalen Struktur einer Glattmuskelzelle (entnommen aus Small & Gimona, 1998)	70
Abbildung 24:	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von (Meta)Vinculin in Glattmuskelgewebe	71
Abbildung 25:	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Lokalisation von (Meta)Vinculin in schneller Skelettmuskulatur	73
Abbildung 26:	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Lokalisation von (Meta)Vinculin im Herzen ..	74
Abbildung 27:	<i>In vitro</i> -Analyse der Aktinfilamentorganisation durch die Vinculin-, bzw. Metavinculin-Schwanzdomäne	77
Abbildung 28:	Analyse der Interaktion der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne mit F-Aktin in Kosedimentationen	78
Abbildung 29:	Bindungskurven für die Interaktion der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne mit F-Aktin	78
Abbildung 30:	Untersuchung des F-Aktin-induzierten Oligomerisierungsverhaltens der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne (AS 858-1066)	79
Abbildung 31:	Untersuchung des F-Aktin-induzierten Oligomerisierungsverhaltens der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne ((M)VT ₈₇₉₋₁₀₆₆)	80
Abbildung 32:	Der Effekt saurer Phospholipide auf die Oligomerisierung der Vinculin-, bzw. Metavinculin-Schwanzdomäne	82
Abbildung 33:	Der Effekt saurer Phospholipide auf die Oligomerisierung mutierter Metavinculin-Schwanzdomänen	83
Abbildung 34:	Charakterisierung der Affinität der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne gegenüber Phospholipiden im Saccharose-Lipidvesikel-Pulldown	84
Abbildung 35:	Densitometrische Auswertung eines Saccharose-Lipidvesikel-Pulldowns mit der Metavinculin-Schwanzdomäne, der Vinculin-Schwanzdomäne sowie zwei Ladungsmutanten der Metavinculin-Schwanzdomäne	85
Abbildung 36:	Vergleichende Analyse der Kompetition von PIP ₂ mit F-Aktin um die Bindung an die (Meta)Vinculin Schwanzdomäne	86
Abbildung 37:	Charakterisierung der PIP ₂ -induzierten Bildung von MVT/VT-Heterodimeren bei verschiedenen Kombinationen der Metavinculin- und der Vinculin-Schwanzdomäne	87
Abbildung 38:	Untersuchung der Bildung von MVT/VT-Heterodimeren im Saccharose-Lipidvesikel-Pulldown	88
Abbildung 39:	<i>In vitro</i> -Analyse der durch unterschiedliche VT/MVT-Gemische induzierten Aktinsuprastrukturen	90
Abbildung 40:	Vergleichende Untersuchung der Kopf-Schwanz-Interaktion von Vinculin und Metavinculin	92
Abbildung 41:	Untersuchung des Einflusses von PIP ₂ auf die Kopf-Schwanz-Interaktion bei Vinculin und Metavinculin	93
Abbildung 42:	Untersuchung der Bindung (Meta)Vinculins an Saccharose-gefüllte Lipidvesikel	94
Abbildung 43:	Schematische Darstellung des Zweischrittmechanismus bei der Konformationsänderung von Vinculin	99
Abbildung 44:	Schematische Darstellung der Kopf-Schwanz-Interaktion bei Vinculin und Metavinculin	101
Abbildung 45:	Schematische Darstellung der unterschiedlichen Bindung von Vinculin und Metavinculin an saure Phospholipide	103
Abbildung 46:	Schematische Darstellung eines hypothetischen Modells zur Entfaltung der Vinculin / Metavinculin-Schwanzdomäne durch die Interaktion mit Aktinfilamenten	105
Abbildung 47:	Schematische Darstellung von parallel, bzw. antiparallel orientierten Dimeren der Vinculin, bzw. Metavinculin-Schwanzdomäne	107

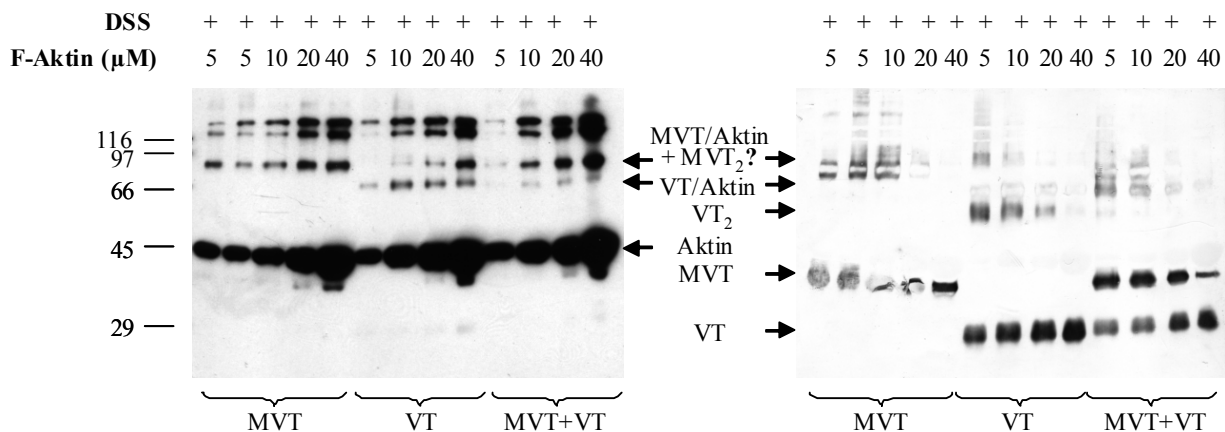
Abbildung 48:	Schematische Darstellung der Wandschichten eines arteriellen Blutgefäßes (entnommen aus: Wehner R. und Gehring W.: <i>Zoologie</i>).....	111
Abbildung 49:	Schematische Darstellung hypothetischer Unterschiede in der Verbindung von Aktinfilamenten durch Vinculinoligomere, bzw. Metavinculin / Vinculin-Heterodimere. .	113

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Aufstellung aller verwendeten Klonierungsoligonukleotide	21
Tabelle 2:	Auflistung der mit Hilfe der in Tabelle aufgelisteten Oligonukleotide hergestellten DNA-Konstrukte	22
Tabelle 3:	Auflistung aller verwendeten Sequenzierungsoligonukleotide.....	22
Tabelle 4:	Zusammenfassung aller verwendeten Erstantikörper	24
Tabelle 5:	Zusammenfassung aller eingesetzten Zweitantikörper und anderer fluorochromierter Agenzien.....	24
Tabelle 6:	Zusammenfassung aller relevanten Daten für die am häufigsten eingesetzten rekombinanten (Meta)Vinculin-Schwanzproteine.....	56
Tabelle 7:	Auswertung der CD-Spektralanalyse für VT ₈₅₈₋₁₀₆₆ , MVT ₈₅₈₋₁₀₆₆ , MVT-NNQ ₈₅₈₋₁₀₆₆ und MVT-QNQ ₈₅₈₋₁₀₆₆	58
Tabelle 8:	Ergebnis von Y2H-Interaktionsuntersuchungen verschiedener potentieller Metavinculin-Liganden.....	60
Tabelle 9:	Auswertung der Quantifizierung der Metavinculin-Expression in verschiedenen Muskelgeweben der Maus nach Western-Blot Analysen (siehe Abbildung 22)	68
Tabelle 10:	Zusammenstellung der biochemischen Eigenschaften der untersuchten (Meta)Vinculin-Schwanzdomänen.....	95
Tabelle 11:	Biochemische und zellbiologische Eigenschaften von nativem Vinculin, bzw. Metavinculin	96

6.3 „Crosslinks“ mit F-Aktin

F-Aktin-„crosslink“ mit (M)VT₈₅₈₋₁₀₆₆



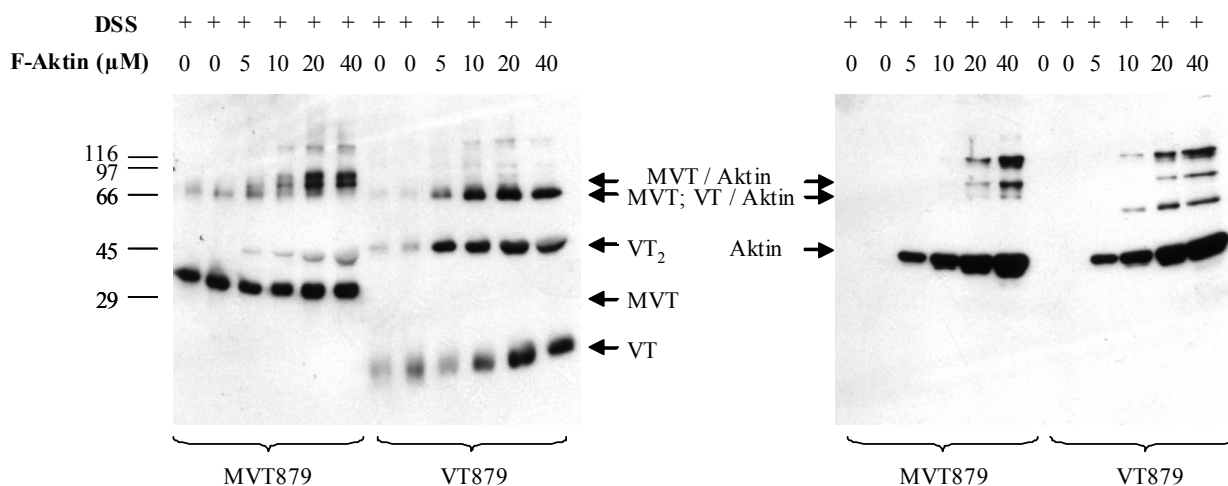
A) Anti-Aktin pK Sigma, 1:200

B) Anti-flag M2, Sigma, 1:10000

Untersuchung des F-Aktin-induzierten Oligomerisierungsverhaltens der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne (AS 858-1066)

DSS-„crosslink“ mit MVT₈₅₈₋₁₀₆₆, VT₈₅₈₋₁₀₆₆ sowie einem Gemisch beider Proteine nach Inkubation mit F-Aktin. Entwicklung des Blots α-FLAG / AP (B) nach vorheriger Entwicklung gegen Aktin / HRP-ECL (A). (M)VT₈₅₈₋₁₀₆₆: 5 μM, VT₂: VT-Dimer

F-Aktin-„crosslink“ mit (M)VT₈₇₉₋₁₀₆₆



A) Anti-tetra-his, Qiagen, 1:800

B) Anti-Aktin pK, Sigma, 1:200

Untersuchung des F-Aktin-induzierten Oligomerisierungsverhaltens der (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne ((M)VT₈₇₉₋₁₀₆₆)

DSS-„crosslink“ mit MVT₈₇₉₋₁₀₆₆, VT₈₇₉₋₁₀₆₆ sowie einem Gemisch beider Proteine nach Inkubation mit F-Aktin. Entwicklung der Blots α-tetra-His (A) und α-Aktin (B). (M)VT₈₇₉₋₁₀₆₆: 5 μM, VT₂: VT-Dimer

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch danke ich sehr für ihre fachliche Unterstützung und die persönliche Ermutigung bei dieser Arbeit. Ihr wissenschaftlicher Weitblick hat mir sehr geholfen, bei meiner Arbeit die richtige Richtung einzuschlagen und den Mut nicht zu verlieren.

Bei Prof. Dr. Dirk Heinz möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Dieter Jahn für die Teilnahme an der Prüfungskommission.

Besonderer Dank gilt Dr. Susanne Illenberger, die mir durch zahlreiche Diskussionen und Anregungen geholfen hat, den wissenschaftlich richtigen Weg zu finden und die Ergebnisse dieser Arbeit durch weiterführende Experimente zu präzisieren. Nicht zuletzt ihr ist es zu verdanken, dass ich meinen Respekt vor neuen, unbekannten Techniken verloren habe. Von unschätzbarem Wert war ihre Unterstützung insbesondere während der Endphase dieser Arbeit. Vielen Dank!!!

Bei Dr. Wolfgang Ziegler möchte ich mich herzlich für die Hilfe bei der Handhabung von Phospholipiden und der FPLC bedanken.

Ein großes Dankeschön gebührt ebenso Sabine Buchmeier für die viele Arbeit bei der Herstellung Metavinculin-spezifischer Antikörper, die Hilfe bei deren Charakterisierung und die geduldige Einführung in die Gefrierschnitttechnik.

Liebes Labor 167-Team: Vielen Dank für die schönen (fast) drei Jahre in Eurem Labor und für die Toleranz meines zeitweise nicht ganz so ausgeprägten Ordnungssinnes. Liebe Tania, vielen Dank für Deine Unterstützung in allen Labor-Lebenslagen!

Besonders bedanken möchte ich mich bei Ulrich Tigges, mit dem ich beim Squash-Spielen den Laborfrust ablassen konnte und der mir in der gemeinsamen Zeit in dieser Arbeitsgruppe und beim Bloody Mary-Trinken ein guter Freund geworden ist (obwohl er immer grad noch 5 Minuten brauchte).

Ebenso gebührt mein Dank Dr. Diana Fleckenstein und Nina Wittenmeyer, die mit mir zusammen das Bio-Trio von Labor 066 gebildet haben. Vielen Dank für die Aufnahme in Euer Labor, die gemeinsame schöne Zeit, den guten Zusammenhalt und Eure Freundschaft. Liebe Diana, vielen Dank für das Lesen dieser Arbeit und das Korrigieren von zu vielen jedochs, interessanterweises und interferiert!

Auch bei Marcell Lederer, der aus dieser Arbeitsgruppe einfach nicht wegzudenken ist, möchte ich mich für die Hilfe bei zahllosen technischen Problemen bedanken.

Für die Danksagung an alle anderen, die mir mit zahllosen Kleinigkeiten den Laboralltag erleichtert und verschönert haben, fehlt leider der Platz, seid aber sicher, dass ich Euch das nicht vergessen werde!!

Meiner Mutter möchte ich an dieser Stelle Dank für ihre finanzielle Unterstützung und ihren bedingungslosen Rückhalt in allen Lebenslagen aussprechen.

Liebe Anke, Deine liebevolle Unterstützung, Dein Optimismus und Dein Verständnis waren in den letzten drei Jahren von unschätzbarem Wert für mich. Danke dafür, dass Du mich durch eine gemeinsame schöne Zeit von Laborproblemen abgelenkt und mir den Kopf gewaschen hast, wenn es mal wieder nötig war. Vielen, vielen Dank!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sebastian Witt
Geburtsdatum: 3. Februar 1975
Geburtsort: Berlin
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1981-1983 Viktor-Gollancz-Grundschule Berlin-Frohnau
1983-1985 Grundschule Salzgitter-Thiede
1985-1987 Orientierungsstufe Salzgitter-Thiede
1987-1994 Gymnasium Große Schule Wolfenbüttel

Studium

1994-2000 Studium der Biologie an der TU Braunschweig
03/1999-02/2000 Diplomarbeit an der GBF Braunschweig, AG Zellbiologie, Prof. Dr. J. Wehland; Thema: „Identifikation neuer Bindungspartner der Homer-2b-Proteins mit Hilfe des *lexA*-Zwei-Hybrid-Systems“

Promotion

Seit 04/2000 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Zoologie/Zellbiologie der TU Braunschweig unter der Leitung von Frau Prof. Dr. B.M. Jockusch; „Vergleichende Charakterisierung der Adhäsionsproteine Vinculin und Metavinculin: Neue Aspekte der zellulären Funktion von Metavinculin“

